

Université de Montréal

# **Mécanismes de suppression tumorale impliqués lors de la sénescence induite par les oncogènes**

par

Frédérick Antoine Mallette

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de doctorat  
en biochimie

Juin 2007

© Frédéric Antoine Mallette, 2007



BF

22

U54

2007

N. ~~04~~ 2

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Mécanismes de suppression tumorale impliqués lors de la sénescence induite par les  
oncogènes

présentée par :

Frédérick Antoine Mallette

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

[Taper le nom] , président-rapporteur *Guy Boileau*

Gerardo Ferbeyre, directeur de recherche

[Taper le nom] , membre du jury *Christian Boivin*

[Taper le nom] , examinateur externe *Chantal Hébert*

[Taper le nom] , représentant du doyen de la FES *Luc Desrosiers*



## RÉSUMÉ

La sénescence cellulaire intervient rapidement lors du processus de tumorigenèse afin de prévenir la prolifération de cellules potentiellement malignes. Pour être efficace, cette réponse doit pouvoir être déclenchée par différents oncogènes et résister à l'inactivation accidentelle de certaines de ses composantes. La redondance des voies reliant les oncogènes aux suppresseurs tumoraux qui exécutent la sénescence permet d'assurer sa fonction en cas de défaillance partielle.

Afin d'élucider les mécanismes de suppression tumorale lors de la sénescence, nous avons étudié l'impact de l'expression de différents oncogènes dans des cellules normales. Tout d'abord, nous avons utilisé les oncoprotéines E6 et E7 pour inactiver p53 et Rb séparément afin de déterminer leur importance relative lors de la sénescence induite par PML. Bien que PML active p53, la sénescence induite par PML dépend plutôt de Rb. Par la suite, nous avons établi un nouveau modèle de sénescence chez les cellules normales exprimant une forme constitutivement activée de STAT5A, dont l'activation fut déjà reliée à différents cancers. STAT5A et B sont des facteurs de transcription activés par de nombreuses cytokines et qui régulent le cycle cellulaire, la prolifération, l'apoptose et la différenciation de plusieurs tissus. Grâce à un mutant constitutivement activé de STAT5A, il fut possible de démontrer que STAT5 stimule la voie de Rb en diminuant les niveaux de CDK4 et engage la voie de p53 via l'induction de PML et par l'activation de la voie de réponse au dommage à l'ADN. L'inactivation génétique de Rb, p53, PML ou ATM individuellement n'élimine pas la sénescence induite par STAT5. Toutefois, la sénescence peut être contournée par la combinaison de traitements inactivant simultanément les voies de p53 et Rb. De plus, la suppression de la voie de réponse au dommage à l'ADN par déplétion d'ATM en coopération avec l'inactivation de Rb bloque les sénescences induites par Ras et STAT5.

Rassemblées, ces données supportent l'hypothèse que la sénescence cellulaire empêche l'expansion de cellules exprimant un oncogène activé. Nos résultats relient

également la voie de réponse au dommage à l'ADN à la sénescence induite par les oncogènes. Nous suggérons également que la sénescence forme un réseau complexe de suppresseurs tumoraux pouvant être activé par différents oncogènes et permettant une suppression tumorale efficace malgré la défaillance de certaines de ses composantes.

**Mots-clés :** Oncogène, sénescence, p53, Rb, PML, STAT5, Ras, suppression tumorale, cancer, dommage à l'ADN.

## ABSTRACT

Cellular senescence acts early in the tumorigenic process to prevent the expansion of potentially malignant cells. To be successful, this response must be accessible to multiple oncogenic signals and resist the accidental inactivation of its individual components. In theory, this could be achieved when several redundant components connect oncogenes to the tumor suppressors that execute the senescence program.

To better understand the tumor suppressor mechanisms underlying the senescence response, we studied the impact of different oncogenes in normal cells. First, we used the viral oncoproteins E6 and E7 to inactivate the p53 and Rb pathways separately to determine their relative importance during PML-induced senescence. Although the fact that PML activates p53 during senescence, PML-induced senescence rely mostly on the Rb pathway. To elucidate the nature of the sensor of the oncogenic stress during the senescence program, we first established a novel model of oncogene-induced senescence in normal cells expressing an activated allele of STAT5A, which has been linked to several human malignancies. STAT5A and B are transcription factors activated by several cytokines and regulate the cell cycle, growth, death and differentiation in multiple tissues. Using a constitutive allele of STAT5A, we demonstrated that activation of STAT5 engaged the Rb pathway by downregulation of CDK4 and the p53 pathway by a variety of mechanisms that included the induction of PML and DNA damage signaling. Genetic changes leading to inactivation of the Rb, p53, PML or ATM pathways individually did not eliminate the senescence response to activated STAT5. However, senescence was bypassed by combining a treatment that inactivates both the Rb and the p53 pathways. Interestingly, suppressing DNA damage signaling by depletion of ATM with Rb inactivation successfully bypassed both STAT5- and Ras-induced senescence.

Together, our findings lend further support to the idea that cellular senescence prevents the expansion of cells bearing activated oncogenes. Our results link DNA damage signaling to oncogene-induced senescence. We also suggest that the senescence response

evolved as a complex tumor suppressor network that can be activated by multiple oncogenic pathways and that ensures tumor suppression despite the inactivation of some of its components.

**Keywords :** Oncogene, senescence, p53, Rb, PML, STAT5, Ras, tumor suppression, cancer, DNA damage.

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	III
ABSTRACT .....	V
TABLE DES MATIÈRES .....	VII
LISTE DES TABLEAUX .....	XIV
LISTE DES FIGURES .....	XV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XIX
REMERCIEMENTS .....	XXII
AVANT-PROPOS .....	1
INTRODUCTION .....	3
1. TRANSFORMATION CELLULAIRE ET CANCER .....	3
1.1 Le chemin menant à la transformation .....	4
1.2 Mécanismes de suppression tumorale .....	6
2 LA SÉNESCENCE RÉPLICATIVE ET LES TÉLOMÈRES .....	7
2.1 Le potentiel réplcatif limité des cellules normales : la genèse .....	7
2.2 Les télomères : recenseur des divisions cellulaires .....	7
2.3 L'hypothèse télomérique du vieillissement cellulaire .....	9
2.4 Est-ce le raccourcissement ou la dysfonction des télomères qui induit la sénescence réplcatif ? ..	10
3 PHÉNOTYPE ET CARACTÉRISTIQUES DES CELLULES SÉNESCENTES .....	14
4 LA SÉNESCENCE PRÉMATURÉE .....	18
4.1 Sénescence prématurée induite par les oncogènes .....	19
4.1.1 Le modèle classique : La sénescence induite par Ras .....	19
4.1.2 Autres oncogènes causant la sénescence prématurée .....	20
4.1.3 La voie de signalisation de JAK-STAT et l'oncogène STAT5 .....	20a
4.2 Sénescence, choc de culture et stress oxydatif .....	21
4.2.1 Conditions inappropriées de culture des cellules normales .....	21

4.2.2 Endommagement de l'ADN: inducteur de la sénescence .....	21
5 VOIES DE SUPPRESSION TUMORALE IMPLIQUÉES LORS DE LA SÉNESCENCE.....	22
5.1 Le suppresseur tumoral p53 .....	23
5.1.1 Modifications post-traductionnelles de p53 .....	23
5.1.1.1 Phosphorylation de p53 .....	26
5.1.1.2 Modification des lysines .....	26
5.1.1.2.1 Acétylation de p53 .....	27
5.1.1.2.2 Ubiquitination et dégradation de p53 .....	27
5.1.2 Régulation des niveaux de p53 par la modulation de l'activité de Mdm2 .....	28
5.1.3 L'axe ARF-p53 .....	28
5.1.4 L'implication du nucléole dans l'activation de p53 .....	29
5.1.5 Régulation transcriptionnelle des niveaux de p53 .....	30
5.1.6 Cibles transcriptionnelles de p53 potentiellement responsables de l'arrêt de croissance et de la sénescence .....	30
5.1.6.1 miR-34.....	31
5.1.6.2 p21 .....	31
5.1.6.3 PAI-1 .....	33
5.1.6.4 PML.....	34
5.2 <i>INK4b/ARF/INK4a</i> : Un locus suppresseur de tumeur.....	34
5.2.1 Les activateurs du locus <i>INK4b/ARF/INK4a</i> .....	35
5.2.1.1 Ras, Raf, p38.....	35
5.2.1.2 Myc.....	38
5.2.1.3 E2F .....	38
5.2.2 Les répresseurs du locus <i>INK4b/ARF/INK4a</i> .....	39
5.2.2.1 p53 .....	39
5.2.2.2 Id1 .....	39
5.2.2.3 Pokemon/TBX2/TBX3 .....	39
5.2.2.4 Domaine de régulation et Cdc6 .....	40
5.2.2.5 Protéines Polycomb.....	40
5.3 Le suppresseur tumoral Rb.....	42
5.3.1 Les sous-groupes de la famille E2F .....	43
5.3.2 Contrôle de l'activité E2F.....	43
5.3.2.1 Régulation de l'activité cycline/CDK .....	44
5.3.3 Rb et sénescence.....	44
5.3.4 Rb et formation de l'hétérochromatine associée à la sénescence .....	45
5.3.5 Connexion des voies de Rb et de p53 .....	46

5.3.6 Importance relative des axes p16 <sup>INK4a</sup> -Rb et p14 <sup>ARF</sup> /p19 <sup>ARF</sup> -p53 dans la suppression tumorale chez l'humain et la souris .....	47
5.4 La protéine PML .....	49
5.4.1 Leucémie promyélocytique aiguë et PML .....	49
5.4.2 Le domaine RING : Structure et fonction .....	49
5.4.3 PML forme des structures sub-nucléaires .....	52
5.4.3.1 Les corps nucléaires PML : entrepôts nucléaires? .....	53
5.4.4 Régulation de l'expression de PML .....	56
5.4.5 PML, cancer et suppression tumorale .....	56
5.4.5.1 Modèle de l'origine de APL .....	56
5.4.5.2 Perte de l'expression de PML dans les cancers .....	57
5.4.5.3 PML, prolifération des cellules tumorales et angiogenèse .....	58
5.4.6 PML et sénescence .....	59
5.4.6.1 PML et activation des suppresseurs tumoraux .....	60
5.4.6.2 PML, Rb et répression transcriptionnelle .....	61
5.4.6.3 PML et SAHF .....	62
5.4.7 PML, stabilité génomique et réponse de dommage à l'ADN .....	62
5.5 Sénescence et réponse de dommage à l'ADN .....	63
5.5.1 La voie de signalisation du dommage à l'ADN .....	63
5.5.1.1 Les initiateurs de la réponse au dommage à l'ADN .....	63
5.5.1.2 Les médiateurs de la réponse au dommage à l'ADN .....	64
5.5.1.3 Les transducteurs du signal de la réponse au dommage à l'ADN .....	66
5.5.1.4 Les effecteurs de la réponse au dommage à l'ADN .....	66
5.5.2 Les sénescences rélicative et liée au dysfonctionnement des télomères déclenchent une réponse de dommage à l'ADN .....	68
5.5.2.1 Voie de signalisation du dommage à l'ADN, télomères et sénescence .....	70
5.5.2.2 Machinerie de réparation de bris double brin et sénescence .....	71
5.5.2.3 Machinerie de réparation de bris simple brin et sénescence .....	72
5.5.2.4 Syndrome de Werner et sénescence .....	73
6 LA SÉNESCENCE CONSTITUE UN MÉCANISME DE SUPPRESSION TUMORALE .....	74
6.1 La sénescence : mécanisme de suppression tumorale alternatif à l'apoptose .....	74
6.2 La sénescence : mécanisme de suppression tumorale <i>in vivo</i> .....	74
HYPOTHÈSES DE RECHERCHE .....	76
RÉSULTATS .....	78

ARTICLE 1: HUMAN FIBROBLASTS REQUIRE THE RB FAMILY OF TUMOR SUPPRESSORS, BUT NOT P53, FOR PML-INDUCED SENESENCE .....	78
MISE EN CONTEXTE .....	78
ABSTRACT .....	80
INTRODUCTION .....	81
RESULTS .....	84
Expression of E6 and E7 blocks PML-induced senescence in human diploid fibroblasts.....	84
E7 rescues HDFs from PML-induced senescence .....	86
A dominant negative p53 does not block PML-induced senescence.....	87
Cell cycle regulators in PML-induced senescence and in cells expressing HPV oncoproteins.....	88
DISCUSSION.....	90
MATERIALS AND METHODS .....	94
Cells and retroviruses.....	94
Cell proliferation and senescence determination .....	94
Protein expression .....	95
Fluorescence microscopy .....	95
ACKNOWLEDGEMENTS .....	97
REFERENCES .....	98
FIGURES AND LEGENDS .....	103
SUPPLEMENTARY FIGURES AND LEGENDS .....	117
ARTICLE 2: REGULATION OF THE RB PATHWAY BY CDK4 DOWNREGULATION DURING STAT5-INDUCED SENESENCE.....	121
MISE EN CONTEXTE .....	121
ABSTRACT .....	123
INTRODUCTION .....	124
RESULTS .....	126
Constitutively activated STAT5 induces senescence in human cells .....	126
Constitutively active STAT5A induces the downregulation of CDK4 and activation of the Rb pathway in human cells.....	127
Genetic analysis of the Rb pathway during STAT5-induced senescence .....	128
Mechanism of CDK4 downregulation during STAT5-induced senescence .....	128
Myc cooperates with E6 to bypass STAT5-induced senescence .....	130
DISCUSSION.....	131



MATERIALS AND METHODS .....	133
Cells and Retroviruses .....	133
Protein expression analysis .....	133
Luciferase assays.....	134
RNA analysis.....	134
Fluorescence microscopy .....	134
ACKNOWLEDGEMENTS .....	136
ABBREVIATION LIST .....	137
REFERENCES .....	138
FIGURES AND LEGENDS .....	144
SUPPLEMENTARY FIGURES AND LEGENDS.....	158
SUPPLEMENTARY METHODS .....	164
Retroviral vectors .....	164
Antibodies for immunoblots.....	164
Antibodies for indirect immunofluorescence .....	164
SUPPLEMENTARY REFERENCES .....	165
ARTICLE 3: THE DNA DAMAGE SIGNALING PATHWAY IS A CRITICAL MEDIATOR OF ONCOGENE-INDUCED SENESCENCE .....	166
MISE EN CONTEXTE .....	166
ABSTRACT .....	168
INTRODUCTION .....	169
RESULTS AND DISCUSSION .....	171
Induction of p53 and senescence by ca-STAT5A requires ATM.....	171
STAT5A and RasV12 induce a constitutive activation of the DNA damage signaling pathway.....	172
Oncogene-induced DNA damage foci (ODDI) persist in cells that bypassed senescence. ....	174
MATERIAL AND METHODS .....	176
Cells and Retroviruses .....	176
Protein expression analysis .....	176
ACKNOWLEDGEMENTS .....	178
REFERENCES .....	179
FIGURES AND LEGENDS .....	184
SUPPLEMENTARY FIGURES AND LEGENDS .....	192
SUPPLEMENTARY REFERENCES .....	204

ARTICLE 4: THE DNA DAMAGE SIGNALING PATHWAY CONNECTS ONCOGENIC STRESS TO CELLULAR SENESENCE.....	205
MISE EN CONTEXTE .....	205
ABSTRACT .....	207
INTRODUCTION : ONCOGENES AND TUMOR SUPPRESSORS.....	208
Activation of p53 by oncogenes: role of DNA damage. ....	208
DNA damage foci in senescent cells. ....	209
DNA damage foci and DNA replication stress. ....	210
ODDI and transcription. ....	211
ODDI and reactive oxygen species.....	211
p53, Rb and the DNA damage response (DDR). ....	213
Senescence: a metabolically viable state of persistent DDR.....	214
Escape from senescence and DDR. ....	215
CONCLUSIONS .....	217
ACKNOWLEDGEMENTS .....	217
REFERENCES .....	218
FIGURES AND LEGENDS .....	226
DISCUSSION .....	230
LE RÉGULATEUR DE LA SÉNESCENCE PML .....	230
PML et le suppresseur tumoral Rb.....	230
Sénescence induite par PML et cancer du col de l'utérus .....	231
La voie de p53 lors de la sénescence induite par PML.....	231
Les voies de suppression tumorale sont reliées différemment chez l'humain et la souris lors de la sénescence induite par PML.....	232
E6 et E7 permettent d'établir une comparaison des phénotypes de sénescence déclenchés par différents stimuli .....	232
Mécanisme d'activation de Rb par PML .....	233
Régulation de PML durant la sénescence induite par les oncogènes Ras et STAT5.....	234
LA SÉNESCENCE INDUITE PAR STAT5 : UN NOUVEAU MODÈLE .....	237
STAT5, Myc et sénescence .....	237
LA RÉPONSE DE DOMMAGE À L'ADN : SENSEUR DU STRESS ONCOGÉNIQUE .....	239
La sénescence induite par les oncogènes et la réponse de dommage à l'ADN.....	239
Quels sont les causes du dommage de l'ADN lors de la sénescence induite par les oncogènes? .....	240

Dynamique de la réponse de dommage à l'ADN .....	241
Implication des sites de dommage à l'ADN lors de la transformation cellulaire .....	242
L'ACTIVATION CONSTITUTIVE DE STAT5 INDUIT UN PROGRAMME GÉNÉTIQUE MENANT À LA SÉNESCENCE .....	243
La voie de Jak/STAT .....	243
Un gène cible de STAT5 régule la sénescence : SOCS-1, un nouveau joueur .....	243
La voie de TGF- $\beta$ .....	249
La voie des MAPKs .....	250
Les régulateurs du cycle cellulaire.....	251
Le lysosome.....	252
La formation de l'hétérochromatine .....	253
STAT5 ET L'ACTIVATION DE P53 .....	254
LE MODÈLE DE SÉNESCENCE INDUITE PAR STAT5 : RESSOURCE PERMETTANT LA DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX RÉGULATEURS DES VOIES DE P53 ET Rb .....	256
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	262
BIBLIOGRAPHIE .....	263
ANNEXES .....	I
ANNEXE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES DES FIGURES ET TABLEAUX PRÉSENTÉS DANS LA DISCUSSION .....	I
Cellules et rétrovirus.....	I
Immunobuvardages.....	I
Analyse de l'ARN.....	II
ANNEXE II : LISTE DES CONTRIBUTIONS DE L'AUTEUR À D'AUTRES ARTICLES QUE CEUX INCLUS DANS CETTE THÈSE .....	III
ANNEXE III : ACCORD DES COAUTEURS (ARTICLE 1) .....	IV
ANNEXE IV : ACCORD DES COAUTEURS (ARTICLE 2) .....	V
ANNEXE V : ACCORD DES COAUTEURS (ARTICLE 3) .....	VI
ANNEXE VI : ACCORD DES COAUTEURS (ARTICLE 4) .....	VII

# LISTE DES TABLEAUX

## INTRODUCTION

TABLEAU I. Exemples de combinaisons d'altérations génétiques permettant la transformation des cellules humaines et de souris .....	5
--	---

TABLEAU II. Protéines interagissant avec PML ou transitant dans les corps nucléaires PML (PML-NBs) .....	54
--	----

## RÉSULTATS

### ***ARTICLE 1. HUMAN FIBROBLASTS REQUIRE THE RB FAMILY OF TUMOR SUPPRESSORS, BUT NOT P53, FOR PML-INDUCED SENESENCE***

TABLE I. E6/E7 reduce the number of PML bodies in cells expressing oncogenic <i>ras</i> or PML-IV .....	102
---	-----

SUPPLEMENTARY TABLE I. E6 or E7 do not reduce the number of PML bodies when individually expressed .....	120
--	-----

## DISCUSSION

TABLEAU I. Profil d'expression génique lors de la sénescence induite par STAT5 .....	244
--	-----

TABLEAU II. Gènes ciblés par p53 régulés lors de la sénescence induite par STAT5 .....	255
--	-----

TABLEAU III. Suppresseurs tumoraux et oncogènes permettant le contournement de la sénescence et/ou la transformation cellulaire découverts par criblage de différentes banques .....	257
--	-----

# LISTE DES FIGURES

## INTRODUCTION

FIGURE 1. L'hypothèse télomérique du vieillissement cellulaire et de l'immortalisation .....	11
FIGURE 2. Phénotype des cellules sénescents.....	16
FIGURE 2a. Voies de signalisation déclenchées par l'activation de Ras.....	18a
FIGURE 2b. La voie de signalisation de JAK-STAT .....	20c
FIGURE 3. Schéma des différents domaines et des modifications post-traductionnelles de p53 .....	24
FIGURE 3a. Processus de modification des protéines par ubiquitination, sumoylation et neddylation .....	24
FIGURE 4. Régulateurs et organisation du locus INK4b/ARF/INK4a .....	36
FIGURE 5. Représentation schématique des différents isoformes de PML montrant l'assemblage des exons.....	50
FIGURE 6. Représentation de la voie de réponse au dommage à l'ADN .....	65a

## RÉSULTATS

### ***ARTICLE 1. HUMAN FIBROBLASTS REQUIRE THE RB FAMILY OF TUMOR SUPPRESSORS, BUT NOT P53, FOR PML-INDUCED SENESCENCE***

FIGURE 1. Inhibition of PML-induced senescence by retroviral-mediated expression of HPV E6/E7 .....	103
FIGURE 2. Effects of E6/E7 on p53 and Rb localization during PML-induced senescence.....	105
FIGURE 3. Individual expression of E7 is sufficient to inhibit PML-induced senescence .....	107

FIGURE 4. The ability of E7 to bind Rb is required for the inhibition of PML-induced senescence .....	109
FIGURE 5. Dominant negative p53 is not sufficient to inhibit PML-induced senescence .....	111
FIGURE 6. Effects of E6 and E7 on cell cycle regulators in HDFs expressing PML or a control vector .....	113
FIGURE 7. PML-induced senescence in mouse and human normal fibroblasts .....	115
SUPPLEMENTARY FIGURE 1. E7 induces cell death in HDFs.....	117
SUPPLEMENTARY FIGURE 2. Effects of individual expression of E6 and E7 on PML bodies..	119

***ARTICLE 2. REGULATION OF THE RB PATHWAY BY CDK4  
DOWNREGULATION DURING STAT5-INDUCED SENESCENCE***

FIGURE 1. STAT5A activation induces senescence in human cells .....	144
FIGURE 2. STAT5A engages the Rb tumor suppressor pathway by downregulating CDK4.....	146
FIGURE 3. p53 and Rb requirement for STAT5-induced senescence in human cells.....	148
FIGURE 4. CDK4 cooperates with E6 to bypass STAT5A-induced senescence.....	150
FIGURE 5. STAT5A antagonizes Myc on the CDK4 promoter.....	152
FIGURE 6. Decrease of Myc activity during STAT5A-induced senescence and Myc localization to PML bodies.....	154
FIGURE 7. Myc cooperates with E6 to bypass STAT5A-induced senescence .....	156
SUPPLEMENTARY FIGURE 1. Induction of senescence by STAT5A1*6 in BJ fibroblasts .....	158
SUPPLEMENTARY FIGURE 2. Inability of wild type STAT5A to induce senescence.....	160
SUPPLEMENTARY FIGURE 3. Disruption of p53 and Rb pathways blocks PML bodies formation by STAT5A1*6 .....	162

***ARTICLE 3. THE DNA DAMAGE SIGNALING PATHWAY IS A CRITICAL  
MEDIATOR OF ONCOGENE-INDUCED SENESCENCE***

FIGURE 1. ATM is critical for oncogene-induced senescence .....	184
FIGURE 2. DNA damage foci in oncogene-induced senescence .....	186
FIGURE 3. Characterization of the DNA damage signaling pathway in STAT5A-induced senescence .....	188
FIGURE 4. Oncogene-induced DNA damage foci (ODDI) persist after inactivation of the senescence program .....	190
SUPPLEMENTARY FIGURE 1. E2F1-induced senescence is inhibited by shRNAs against p53 or ATM.....	192
SUPPLEMENTARY FIGURE 2. Oncogene-induced foci contain 53BP1 .....	194
SUPPLEMENTARY FIGURE 3. Oncogene-induced foci in cells expressing RasV12 contain activated ATM.....	196
SUPPLEMENTARY FIGURE 4. ATR foci in oncogene-induced senescence and hydroxyurea treated cells .....	198
SUPPLEMENTARY FIGURE 5. Lack of colocalization of $\gamma$ H2AX foci with the telomeric binding protein TRF2 .....	200
SUPPLEMENTARY FIGURE 6. Phospho-ATM foci in cells that bypassed senescence.....	202

***ARTICLE 4. THE DNA DAMAGE SIGNALING PATHWAY CONNECTS  
ONCOGENIC STRESS TO CELLULAR SENESCENCE***

FIGURE 1. Accumulation of ROS in cells expressing two different oncogenes that induce senescence: RasV12 and ca-STAT5A.....	226
FIGURE 2. Senescence is a general response to DNA damage signals .....	228

## DISCUSSION

FIGURE 1. Régulation de l'expression de PML lors des sénescences induites par les oncogènes Ras et STAT5.....	235
FIGURE 2. Régulation de SOCS-1 par STAT5, induction de la sénescence et activation de p53 par SOCS-1 .....	247
FIGURE 3. Méthodologie expérimentale proposée afin d'identifier les régulateurs des voies de p53 et de Rb impliqués lors de la sénescence induite par STAT5 par criblage d'une banque de shRNAs .....	259



## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

- ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
ALT : «Alternative lengthening of telomeres»  
APL : Leucémie promyélocytique aiguë  
ARF : «Alternative reading frame» ou p14<sup>ARF</sup> et p19<sup>ARF</sup>  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ATM : «Ataxia-telangiectasia mutated»  
ATR : «ATM- and Rad3-related»  
CDK : Kinase dépendante de la cycline «Cyclin-dependent kinase»  
COP1 : «Constitutively photomorphogenic 1»  
DAPI : 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride  
GSE : «Genetic suppressor element»  
GSK3 $\beta$  : «Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ »  
HMGA : «High mobility group A»  
INK4 : Inhibiteurs de CDK4  
kpb : Kilo paires de bases  
MAPK : «Mitogen-activated protein kinase»  
Mdm2 : «Mouse double minute 2»  
MEF : «Mouse embryo fibroblasts»  
miRNA : Micro ARN  
NPM : Nucléophosmine  
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne  
PAI-1 : «Plasminogen activator inhibitor-1»  
PI(3)K : «Phosphatidylinositol-3-kinase»  
PIAS : «Protein inhibitor of activated STAT»

Pirh2 : «p53-induced protein with a RING-H2 domain»  
PML : «Promyelocytic leukemia protein»  
PML-NB : «PML nuclear body»  
PRAK : «p38-regulated/activated protein kinase»  
PRC1/2 : «Polycomb repressive complex 1/2»  
pVHL : Protéine von Hippel-Lindau  
Rb : Protéine du rétinoblastome  
REF : «Rat embryo fibroblasts»  
ROS : «Reactive oxygen species»  
SA- $\beta$ -gal : «Senescence associated  $\beta$ -galactosidase activity»  
SAHF : «Senescence-associated heterochromatin foci»  
shRNA : petit ARN en épingle à cheveux  
siRNA : petit ARN interférant  
SOCS : «Suppressor of cytokine signaling»  
STAT : «Signal transducer and activator of transcription»  
SUMO : «Small ubiquitin-like modifier»  
TGF- $\beta$  : «Transforming growth factor-beta»  
TRF : «Terminal restriction fragments»  
uPA : «Urokinase type plasminogen activator»  
VPH : Virus du papillome humain

*«Tous les êtres humains en effet aspirent à  
obtenir l'immortalité par des pratiques  
ascétiques, mais moi c'est par ma bravoure  
que j'ai toujours essayé de la conquérir.»  
Indrajit, Ramayana Chant VII, Chapitre XXX*

## REMERCIEMENTS

Un doctorat représente une longue aventure pleine d'anecdotes, de rencontres et où les bons et mauvais coups alternent de façon cyclique, périodique. De nombreuses relations se créent alors et nous permettent de tenir bon afin d'atteindre l'objectif final : le dépôt de la thèse et l'obtention du fameux diplôme. Je tiens donc à souligner la contribution des nombreuses personnes qui m'ont supporté et ont ainsi mené à l'aboutissement de mon doctorat. Sans vous tous, peut-être n'aurais-je jamais terminé ou aurais-je dû manipuler la pipette pour les cinq prochaines années afin de compléter mon doctorat. Je tiens donc à souligner votre contribution dans ma quête de la compréhension des mécanismes impliqués lors de la sénescence.

Avant tout, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Gerardo Ferbeyre. Peut-être preniez-vous un risque en me sélectionnant aussi rapidement sur la base d'un bref entretien téléphonique, mais de mon côté, je n'ai jamais regretté mon choix. Ce fut toute une aventure que de démarrer votre laboratoire avec vous. Votre enthousiasme et votre motivation ont su tirer le meilleur de moi-même et vous m'avez poussé à dépasser mes limites (et pas juste en heures travaillées!!!). Je vous remercie de m'avoir toujours ouvert la porte de votre bureau afin de discuter longuement de «cellules bleues» ou bien pour régler certains différends. Ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Merci également au Dr Patrick Paddison de m'avoir accueilli dans son laboratoire afin de partager sa librairie de shRNAs. Many thanks Patrick for the good time at Cold Spring Harbor.

Je ne peux passer sous silence la contribution d'Annie Montmarquette à ma formation technique. Je te remercie, Annie, d'avoir démontré autant de patience à m'expliquer comment faire mes premières bactéries compétentes!

Lorsque l'on effectue un doctorat, on passe beaucoup plus de temps au labo qu'ailleurs. Les membres du laboratoire deviennent en quelque sorte une seconde famille. Après plus de cinq ans et demi, les membres du labo ont donc dû subir mes foudres et sautes d'humeur à presque tous les jours. Maniaque des choses bien rangées et fonctionnelles, je sais que je vous ai peut-être rendu la vie dure, surtout pour toi Vincent (sans rancune!). Dans un ordre plutôt chronologique, je tiens à remercier Brigitte Dion avec qui j'ai travaillé lors de la naissance du laboratoire. Puis Marie-France et son rire inimitable et franc. Merci petite Marie pour les centaines de rondes d'infection, les milliers de «Western blots» et les millions de services rendus. Comme ta cuisine, tu es exceptionnelle! Je tiens à remercier ma stagiaire d'été, Botum, qui a contribué à mes recherches. Puis Vincent...Travailler à tes côtés est un plaisir, car tu représentes littéralement une source inépuisable d'humour. Et n'oublie surtout pas Vince : C'est la vie qui chante! Un énorme merci à toi Viviane, véritable complice scientifique. Ta soif de connaissance te permettra d'aller au bout de tes rêves. Merci Viv et à bientôt! Merci aussi à Laurent «Lolo the Dispatcher/Summerboy», partenaire de la salle de culture et ailier assidu dans toutes nos ligues de hockey. Grâce à ton esprit critique, tu obliges tous les membres du laboratoire à se surpasser. On se croisera sûrement à Québec. Bonne chance en médecine et dans tes projets futurs! Merci également au p'tit dernier du labo, Adrian «Rookie». Tu étais toujours prêt à rendre service et en passant Rookie, Ovechkin surpasse Crosby...à presque tous les niveaux!

Merci aux seniors de l'aile A-5, George et Demian. Vous avez représenté la sagesse scientifique tout en démontrant un côté un peu cinglé. Un merci incommensurable aux collègues et amis du cinquième. Membres des laboratoires Boileau (Mathieu et Martin), Desgroseillers (Laurent, Karine, Catherine, Samuel, Marjolaine et Luc «Furax»), Pelletier (Jordan), Chartrand (Nicolas, Yannick et Frank) et Roy (Mathieu, Éric, Jean-Charles et Sophie), ce fut un bonheur de pouvoir échanger et travailler avec vous. Je voudrais toutefois rajouter quelques mentions spéciales. Merci à toi Jordan pour les démos données

ensemble, les nombreux party, les *jam sessions* et le voyage en Jamaïque. Je me souviendrai longtemps de la *honey moon suite*!!! Merci à Martin «Pitch» et Viviane (encore) pour votre amitié, tout simplement. Merci au très grand et vénéré Mathieu St-Louis et par le fait même Mélisa. Vos délicieux repas ont su mettre un baume sur mon esprit torturé par des journées de labo trop chargées. Merci aux volleyeurs et amis Laurent «Loul alias le Français» et Karine «ti-bou» pour votre support sans borne, vos nombreux conseils et les bons moments passés ensemble.

Merci aux ultracentrifugeuses et aux NVT65 du troisième et d'ailleurs, qui ont effectué pour moi plus de 1 071 360 000 rotations. Vive les préparations d'ADN par gradient de chlorure de césium!!!

Je remercie le Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) et l'Institut National du Cancer du Canada (INCC) dont les bourses de recherche m'ont permis de me consacrer pleinement à mes travaux et qui m'ont donné la chance de présenter mes résultats à l'étranger. Je dois également remercier les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) pour les subventions allouées au Dr. Ferbeyre et qui ont défrayées les coûts de mes recherches.

Merci à mes parents, ma mère Jocelyne, mon père Denis, et Lyne. La fierté que vous témoignez envers mon travail a toujours représenté une source de motivation inaltérable. Vous m'avez sans cesse encouragé, soutenu... Je dois également beaucoup à mon grand frère Étienne ainsi qu'à ma petite sœur Julie-Jode avec qui j'ai passé énormément de temps sur la glace et sur les *courts* de tennis. Merci au grand frère «Ets» pour avoir littéralement défriché le terrain tout au long de ma progression. Tu as toujours été le premier à franchir les différentes étapes de la vie et tu m'as fait profiter de ton expérience à chaque fois. Merci à ma petite sœur «Jul» pour ta fougue et ton énergie. Malgré que tu sois la plus jeune, tu es toujours venue en aide à tes frères. Etienne et Julie-Jode, vous m'avez témoigné énormément de soutien, et même plus, lors de mes études et je vous en remercie. Merci à grand-maman Mado aussi et tâche de garder la forme! Un petit

mot pour grand-maman Émilienne qui aurait bien aimé, je crois, voir ce que son petit-fils a accompli. À toute ma famille, je vous adore!

Merci également à mes beaux-parents, Denis et Diane, merci à Catherine et Stéphane, ainsi qu'à mes neveux, Louis et Philippe, qui font de moi un oncle ravi! Merci à tous pour vos encouragements et votre support.

Finalement, je me dois de remercier la force motrice de ma motivation, celle qui me pousse à me surpasser à tous les jours. Ma tendre Véro, merci de m'avoir accompagné durant mes dernières années de doctorat. Sans toi, je n'aurais sûrement jamais terminé. Merci de m'avoir supporté lorsque je devenais insupportable. Avec toi, tout devient si simple et facile. Merci à ton côté rationnel, raisonnable, prudent qui compense si bien mon côté plus spontané et un peu insouciant. Comme le dit si bien la chanson de Carla Bruni : «Je suis ton pile, tu es mon face. Tu es l'envie et moi le geste, toi le citron et moi le zeste. Je suis l'épice, toi la papille. Tu es le ciel et moi la terre. Tu es la flamme, moi l'allumette. Tu es bémol et moi je suis dièse. Tu es la belle et moi la bête. Tu es le corps et moi la tête, tu es le corps, hmmm. Tu es le sérieux, moi l'insouciance. Tu es les éclats de mon rire. Tu es le chant de ma sirène. Toi, tu es le sang et moi la veine. T'es le jamais de mon toujours. T'es mon amour, t'es mon amour». Je t'aime ma douce et merci d'être là, tout simplement.

## AVANT-PROPOS

Les maladies représentent le fondement de la recherche scientifique et pour les esprits contemporains, on ne peut évoquer la maladie sans accorder au cancer une place de choix. Il représente pour notre époque ce que fut la lèpre au XV<sup>e</sup> siècle et la tuberculose pour le XIX<sup>e</sup> siècle : un mal opprimant témoignant de notre impuissance à maîtriser la maladie et la mort. C'est ainsi qu'à chaque époque, l'humanité investit tous ses efforts dans le combat acharné contre ces maladies.

Le cancer n'est toutefois pas un mal récent puisque Hippocrate en faisait déjà une description précise plus de 400 ans avant J.-C. Il utilisa les termes grecs «carcinos» et «carcinoma» pour désigner une tumeur dure, non inflammatoire, avec tendance à la récurrence et à la généralisation, conduisant le patient atteint à une issue fatale [1]. Par la suite, Galien (129,131-201 après J.-C.) introduisit le terme grec «oncos» pour définir une bosse ou une tumeur d'allure maligne. Ce terme explique l'étymologie de nombreux termes reliés au cancer utilisés aujourd'hui dont oncologie et oncogène. L'image moderne du cancer apparaît cependant au début du XX<sup>e</sup> siècle où les recherches s'orientent sur le noyau cellulaire.

Récemment, le cancer ravissait aux maladies cardio-vasculaires la peu fameuse première place des causes de décès au Québec. On estime qu'en 2007, au Québec, il y aura 41 000 nouveaux cas de cancer (159 900 au Canada) et 19 500 décès (72 700 au Canada) dus à cette maladie [2]. En plus de son impact sur la santé, le cancer représente un enjeu économique important. On évalue que le cancer coûtera aux Québécois, au cours des 25 prochaines années, plus de 210 milliards \$ en soins de santé, en assurances salaire et invalidité ainsi qu'en baisse de productivité dans les entreprises [3].

Le cancer ne dévoilera ses secrets que sous les assauts concertés des médecins et des groupes de recherche du domaine biomédical. Il devient donc impératif d'accentuer la recherche afin de permettre l'éradication du cancer et l'amélioration de la qualité de vie des personnes atteintes par cette maladie.



L'étude des mécanismes cellulaires déployés afin de contrer la transformation maligne est alors un aspect important permettant la compréhension de la genèse du cancer. La présente thèse traitera donc de la sénescence déclenchée en réponse à une activité oncogénique ainsi que de mécanismes moléculaires impliqués lors de ce programme.

# INTRODUCTION

## 1. Transformation cellulaire et cancer

Une révolution est survenue dans le domaine de la recherche contre le cancer lorsqu'il fut réalisé que le cancer est en fait une maladie génétique. Durant la dernière décennie, de nombreux gènes, et leurs mutations, impliqués dans l'établissement du cancer furent identifiés. L'altération de trois types de gènes, soit les oncogènes, les suppresseurs tumoraux et les gènes de stabilité, est responsable de la tumorigenèse. Contrairement à des maladies comme la dystrophie musculaire et la fibrose kystique qui sont causées par la mutation d'un gène unique, le cancer survient suite à la défectuosité de plusieurs gènes. Il est alors pertinent de considérer les gènes mutés associés au cancer comme des gènes contribuant à la maladie plutôt que causant le cancer.

La mutation d'un oncogène, comme *Myc*, *Ras*, *BRAF* ou *Jak2*, lui confère une activité constitutive et non-régulée. L'apparition d'une telle mutation accorde un avantage prolifératif à la cellule. Les gènes de suppression tumorale sont, quant à eux, régulés de façon inverse puisque leur mutation réduit l'activité du gène. L'altération de la fonction des suppresseurs tumoraux peut survenir par l'apparition de mutations non-sens, de délétions ou d'insertions ainsi que par des changements épigénétiques. La mutation d'un suppresseur tumoral, *p53* ou *Rb* par exemple, cause la perte de la régulation de la croissance cellulaire. La mutation des oncogènes et des suppresseurs tumoraux participe de façon analogue à la formation de tumeurs en augmentant le nombre de cellules tumorales via la stimulation de la croissance et l'inhibition de la mort cellulaire ou de l'arrêt du cycle cellulaire. La troisième classe de gènes associés au cancer, dénommés gènes de stabilité, stimule toutefois la tumorigenèse d'une toute autre façon. Les gènes de stabilité regroupent les gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité génomique en permettant la reconnaissance et la réparation de l'ADN comme *ATM*, *NBS1* ou *BRCA1/2*. Les gènes de stabilité permettent de

maintenir un faible taux de mutation, mais leur propre inactivation augmente le taux d'altérations génétiques pouvant ainsi affecter les oncogènes et suppresseurs tumoraux [4].

Les mutations de ces trois classes de gènes peuvent provenir des cellules germinales, résultant ainsi en syndrome héréditaire de prédisposition au cancer, ou survenir de façon sporadique dans les cellules somatiques.

### **1.1 Le chemin menant à la transformation**

La transformation cellulaire est un processus progressif nécessitant plusieurs changements génétiques ou épigénétiques. L'utilisation de modèles *in vitro* de transformation cellulaire de cellules humaines et de souris suggère qu'un nombre défini de modifications génétiques coopèrent afin d'atteindre un état malin. Chez les cellules de souris, l'introduction de paires d'oncogènes, telles E1A et Ras ou Myc et Ras, est suffisante à la transformation [5, 6]. La perte d'expression ou de fonction de p53 facilite toutefois la transformation par ces paires d'oncogènes chez la souris [7, 8]. Ces données suggèrent que peu d'altérations sont requises à la transformation de cellules de souris. En fait, la perturbation des voies de p53 et Raf semble suffisante à la conversion tumorigénique de ces cellules [9].

Toutefois, la transformation des cellules humaines nécessite des modifications additionnelles puisque l'expression de Myc et Ras n'est pas suffisante à leur conversion en cellules cancéreuses [10]. Des études récentes ont permis l'identification de différentes combinaisons de gènes collaborant afin de permettre la transformation de plusieurs types cellulaires humains (Tableau I) [9, 11-20]. La conversion tumorigénique de cellules humaines requiert la perturbation de plusieurs voies dont celles de p53, Rb, Ras/Raf, PTEN/PP2A et de la télomérase. La combinaison des altérations génétiques nécessaires à la transformation dépend cependant du type cellulaire [9].

**Tableau I. Exemples de combinaisons d'altérations génétiques permettant la transformation des cellules humaines et de souris.**

<b>Fibroblastes embryonnaires murins</b>	dn-p53 + c-Myc + Ras <sup>V12</sup> [18] LT + Ras <sup>V12</sup> [9] Chk2 <sup>-/-</sup> + Ras <sup>V12</sup> [21]
<b>Fibroblastes humains</b>	dn-p53 + c-Myc + Ras <sup>V12</sup> + hTERT + Rb-shRNA + st [18] dn-p53 + c-Myc + Ras <sup>V12</sup> + hTERT + Rb-shRNA + PTEN-shRNA [18] dn-p53 + c-Myc + Ras <sup>V12</sup> + Rb-shRNA + st [18] Ras <sup>V12</sup> + hTERT + SV40-ER [9, 12, 13] Ras <sup>V12</sup> + hTERT + LT + st [13] Ras <sup>V12</sup> + hTERT + E6/E7 + st [13] p53-shRNA + p16-shRNA + Ras <sup>V12</sup> + hTERT + st [16] dn-p53 + Ras <sup>V12</sup> + hTERT + CDK4 + Cycline D1 + ST [13] E1A + Ras <sup>V12</sup> + Mdm2 [15]
<b>Cellules épithéliales mammaires humaines</b>	Ras <sup>V12</sup> + hTERT + SV40-ER [20] dn-p53 + Myc <sup>T58A</sup> + Ras <sup>V12</sup> + hTERT + CDK4 + Cycline D1 [19]

Abréviations : dn-p53 (dominant négatif de p53), LT (antigène grand T de SV40), st (antigène petit t de SV40), SV40-ER (région de SV40 incluant LT et st), hTERT (sous-unité catalytique de la télomérase).

La grande résistance des cellules humaines à la transformation induite par différentes combinaisons oncogéniques comparativement aux cellules de souris suggère la présence de mécanismes de suppression tumorale plus stables qui utilisent des voies indépendantes et redondantes chez l'humain.

## **1.2 Mécanismes de suppression tumorale**

Plusieurs des altérations oncogéniques permettant la transformation ne sont pas essentielles à la prolifération en tant que telle. Toutefois, elles causent le découplage de la machinerie de croissance dérégulée des cellules malines et des mécanismes de contrôle de la prolifération permettant de reconnaître et mettre fin à l'expansion aberrante des cellules. Deux mécanismes complémentaires possèdent la capacité de freiner la progression tumorigénique des cellules : l'apoptose et la sénescence.

L'apoptose constitue un suicide cellulaire programmé essentiel au développement embryonnaire et à l'homéostasie des tissus. La mort cellulaire par apoptose est associée à de nombreux traits caractéristiques dont la fragmentation de l'ADN et du noyau, le bourgeonnement membranaire ainsi que la perte de l'asymétrie membranaire. Les voies permettant de déclencher l'apoptose sont bien définies et dépendent de voies intrinsèques et extrinsèques (pour une revue [22]).

La sénescence, quant à elle, peut être considérée comme une différenciation terminale où la cellule conserve l'intégrité de son noyau et de sa membrane plasmique, mais maintient un arrêt permanent du cycle cellulaire. Grâce à sa capacité à bloquer la progression cellulaire, le programme de sénescence doit être contourné afin de permettre la formation de tumeurs. La sénescence incarne donc un mécanisme de suppression tumorale au même titre que l'apoptose.

## **2 La sénescence répllicative et les télomères**

### **2.1 Le potentiel réplcatif limité des cellules normales : la genèse**

En 1961, Leonard Hayflick publie un article démontrant que, contrairement aux lignées cellulaires, les fibroblastes normaux humains sont capables de proliférer seulement pendant un nombre limité de divisions cellulaires, après lesquelles ils changent de morphologie et arrêtent définitivement de se diviser [23]. Le terme sénescence cellulaire est alors utilisé afin de décrire l'arrêt de croissance terminal limitant la propagation des fibroblastes diploïdes humains en culture. On nomme maintenant ce phénomène sénescence répllicative puisqu'elle est directement liée à la division cellulaire. Hayflick propose alors que les cellules normales sont mortelles et qu'elles doivent subir certains changements afin de devenir immortelles comme les cellules provenant de cancers. Cette affirmation fut fondamentale à la compréhension des mécanismes menant au vieillissement ainsi qu'au cancer. Les travaux menés par Hayflick montrent également que la capacité de proliférer des fibroblastes normaux humains est inversement proportionnelle à l'âge du donneur duquel elles proviennent [24]. La capacité limitée des cellules normales de proliférer en culture suggère l'existence d'un mécanisme permettant de compter les divisions cellulaires.

### **2.2 Les télomères : recenseur des divisions cellulaires**

Des études menées vers la fin des années 1930 par Muller chez la drosophile et par McClintock chez le maïs ont démontré que les extrémités des chromosomes sont couvertes d'une structure nommée télomère qui prévient les fusions chromosomiques [25, 26]. Par la suite, l'analyse de la réplication de l'ADN ribosomique chez *Tetrahymena* a permis la découverte que leurs extrémités sont constituées de séquences répétées  $(TTGGGG)_n$  et que ces mêmes séquences se retrouvent aux bouts des chromosomes [27]. Plus tard, le clonage

des télomères humains montrera qu'ils contiennent également des séquences répétées  $(TTAGGG)_n$  très conservées parmi les vertébrés [28, 29].

Pendant ce temps, l'étude de la réplication de l'ADN mène à un léger problème. En 1972, James Watson, par l'étude de la formation de concatémères d'ADN du phage T7, constate que l'ADN polymérase ne peut compléter la réplication de l'extrémité d'un fragment linéaire d'ADN [30]. On nomme alors ce phénomène le problème de la réplication terminale (*the end-replication problem*). Cependant, un an auparavant, Olovnikov arrive à la même conclusion [31, 32]. En fait, l'ADN polymérase requiert une amorce d'ARN afin d'effectuer la synthèse en direction 5'-3'. La synthèse de l'extrémité du brin retardé n'est alors pas possible puisque l'événement de réplication ultime ne peut avoir lieu sans une amorce d'ARN qui doit être finalement retirée. Aussitôt, Olovnikov propose que le problème de réplication terminale devrait engendrer le raccourcissement progressif des télomères à chaque ronde de réplication et que ce phénomène constituerait la cause de la sénescence répliative. Trois conclusions majeures furent émises par Olovnikov :

- 1) le raccourcissement progressif des extrémités des chromosomes fournit une explication au potentiel limité de prolifération des cellules normales en culture tel qu'observé par Hayflick;
- 2) l'extrémité des chromosomes ne contient aucune information génétique, mais sert de région tampon sacrifiée à chaque division;
- 3) l'ajout à l'extrémité des chromosomes de séquences supplémentaires constitue un moyen de prolonger la longévité des cellules et donc, que les cellules capables de prolifération illimitée comme les cellules germinales, souches et tumorales doivent maintenir l'extrémité de leurs chromosomes.

Or, le modèle proposé par Olovnikov s'est avéré terriblement juste puisque l'on considère maintenant que le raccourcissement des télomères est la cause principale de la

sénescence réplivative. Les télomères constituent donc des horloges moléculaires permettant de compter les divisions cellulaires.

### 2.3 L'hypothèse télomérique du vieillissement cellulaire

Bien qu'il avait été déjà démontré que les télomères raccourcissent après chaque division cellulaire [33], la découverte confirmant le lien existant entre les télomères et la sénescence réplivative survient suite à la découverte de la télomérase [34]. La télomérase est une transcriptase inverse capable d'allonger l'extrémités des télomères (pour une revue [35]). Cette enzyme est constituée d'une sous-unité catalytique nommée hTERT [36-40] ainsi que d'un fragment d'ARN appelé hTR/Terc servant de gabarit [41]. L'expression de la sous-unité catalytique hTERT permet de contourner la sénescence réplivative dans les fibroblastes et les cellules épithéliales de la rétine [42, 43]. Les cellules exprimant hTERT possèdent des télomères plus longs, se divisent rapidement, démontrent moins d'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence, un biomarqueur de sénescence (voir section *Phénotype et caractéristiques des cellules sénescents*), et ne présentent aucun signe de transformation [44, 45]. De plus, l'expression transitoire de hTERT pendant sept divisions cellulaires dans des fibroblastes permet l'élongation des télomères de 2,5 kpb. Après quoi ces fibroblastes se divisent pendant environ 50 doublements avec un raccourcissement des télomères d'environ 50 pb par division avant d'entrer en sénescence réplivative [46]. Ces données suggèrent que c'est la taille des télomères et non l'expression de hTERT qui prolonge la longévité des cellules. Inversement, l'inhibition de la télomérase grâce au gène PinX1 ou par la molécule chimique BIBR cause un raccourcissement progressif des télomères et induit la sénescence [47, 48].

Puisque les télomères représentent un facteur crucial au contrôle de la capacité de proliférer, Harley et collègues proposèrent la théorie des télomères afin d'expliquer le



vieillissement et le cancer [49, 50] (Figure 1). Les grands points de cette théorie sont les suivants :

- 1) les télomères sont maintenus durant la gamétogenèse grâce à la télomérase afin de prévenir le raccourcissement des télomères d'une génération à l'autre;
- 2) l'activité de la télomérase est réprimée dans les cellules somatiques suite à la différenciation;
- 3) les cellules somatiques subissent un raccourcissement des télomères à chacune des divisions cellulaires causé par le problème de la réplication des extrémités et par l'absence de télomérase. Lorsque leurs télomères atteindront un seuil critique, un signal de contrôle sera généré et ces cellules entreront en sénescence;
- 4) le contournement de la sénescence par l'expression d'oncogènes ou des mutations permet aux cellules de proliférer malgré leurs télomères courts jusqu'à l'entrée en crise suivie de la mort cellulaire;
- 5) suite à la phase de crise, certaines cellules immortelles émergeront par l'acquisition de la capacité à maintenir les télomères.

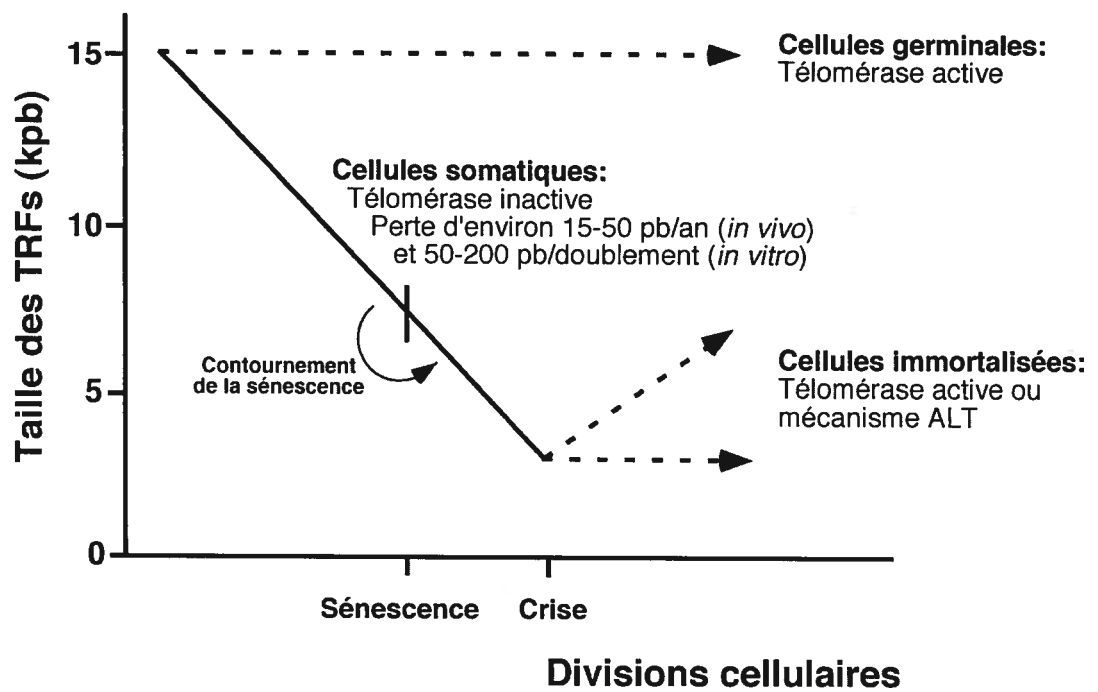
#### **2.4 Est-ce le raccourcissement ou la dysfonction des télomères qui induit la sénescence répliative ?**

L'érosion progressive des télomères en fonction de la prolifération résulte éventuellement au raccourcissement critique d'un ou plusieurs télomères qui déclenche alors l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence répliative [51]. Bien que la taille des télomères semble réguler le potentiel de prolifération des cellules, les mécanismes précis impliqués lors de la sénescence répliative sont plus complexes. Tout d'abord, les télomères de la plupart des cellules sénescents sont plutôt longs oscillant entre 5 et 10 kpb [33, 52]. Lors d'expériences d'immortalisation par la télomérase, il fut observé que les cellules immortalisées possédaient des télomères plus courts que ceux des cellules contrôles

**Figure 1. L'hypothèse télomérique du vieillissement cellulaire et de l'immortalisation.**

Les cellules germinales maintiennent la taille de leurs télomères grâce à la télomérase. Les cellules somatiques, n'exprimant pas la télomérase, subissent un raccourcissement progressif des télomères à chacune des divisions cellulaires. Lorsque les télomères atteignent un seuil critique, ces cellules entrent en sénescence. Le contournement de la sénescence grâce à des oncoprotéines virales, par exemple, permet la prolifération malgré leurs télomères plus courts. Toutefois, ces cellules entreront dans une phase nommée crise lorsque leurs télomères atteindront un second seuil critique. La phase de crise est accompagnée d'une forte mort cellulaire, mais certaines cellules réactiveront la télomérase afin de maintenir ou d'allonger la taille des télomères. Cependant, environ 10% des tumeurs ne semblent pas réactiver la télomérase mais utilisent plutôt un mécanisme alternatif d'allongement des télomères (ALT). La taille des télomères est exprimée selon la taille des fragments de restriction terminaux (TRF) contenant des séquences subtélomériques en plus des télomères. D'après [53].

Figure 1



en arrêt de croissance [54, 55]. De plus, les cellules immortalisées exprimant la télomérase et possédant des télomères plus courts subissent moins de fusions chromosomiques, événements caractéristiques aux télomères courts [56]. Aussi, l'accélération expérimentale du raccourcissement des télomères n'affecte pas l'avènement de la sénescence [57]. Puisque la taille des télomères seule ne peut expliquer ces observations, d'autres facteurs doivent être impliqués.

Il fut alors suggéré que le raccourcissement des télomères induirait un bris de la structure des télomères et que l'altération de cette structure serait responsable de l'entrée en sénescence. Les télomères forment une structure avec un complexe protéique nommé shelterin ou télosome composé de 6 protéines, TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 et Rap1 (revue dans [58]). Le complexe shelterin affecte la structure des télomères en favorisant la formation de boucles t [59, 60]. Grâce à la microscopie électronique, il fut démontré que les télomères ne sont pas toujours linéaires, mais peuvent former une structure complexe en boucle nommée boucle t. Les télomères possèdent à leur extrémité 3' une longue série de répétitions TTAGGG simple brin qui peut envahir l'ADN télomérique double brin et déplacer un des brins afin de s'apparier avec l'autre [58].

Or, l'inhibition de différents facteurs impliqués dans la formation du complexe shelterin/télosome peut causer une dysfonction des télomères et induire la sénescence. L'utilisation d'une forme dominante négative de TRF2 induit la fusion des chromosomes et cause l'entrée en sénescence [61, 62]. L'ablation de l'expression de l'exonucléase Apollo, partenaire de TRF2, induit également l'entrée prématurée en sénescence [63] tout comme la délétion de POT1 [64, 65]. Ces données suggèrent que la sénescence répllicative pourrait être causée par la perte de fonction du complexe shelterin/télosome survenant lorsque les télomères deviennent courts.

Des évidences suggérant que le bris de la structure télomérique survient lors de la sénescence répllicative ont été obtenues par l'observation de l'érosion de l'extrémité simple brin des télomères chez les cellules sénescents. Durant la sénescence, la taille moyenne des extrémités simple brin des télomères atteint moins de 100 nt [66], ce qui briserait

potentiellement la boucle t qui requiert une extrémité simple brin d'au moins 100 nt [59, 60]. De plus, l'expression de hTERT permet non seulement d'allonger la taille des télomères, mais génère également des extrémités simple brin plus longues protégeant ainsi la structure des télomères [66]. La télomérase semble effectivement jouer un rôle important dans le maintien de la structure télomérique chez les cellules normales. Bien qu'il fut précédemment démontré que les cellules somatiques humaines étaient dépourvues de télomérase [67], une étude plus récente suggère que la télomérase est présente chez ces cellules [68]. L'inhibition de l'activité de la télomérase chez les cellules normales humaines déclenche l'entrée en sénescence sans toutefois déclencher un raccourcissement notable de la taille des télomères. Toutefois, l'extrémité simple brin des télomères était significativement plus courte chez ces cellules, suggérant un rôle important joué par la télomérase dans le maintien de la structure télomérique.

Il est maintenant clair que la taille et la structure des télomères ainsi que la télomérase affectent la longévité répliative des cellules humaines, mais la relation entre ces éléments et la contribution relative de ces paramètres au phénotype de sénescence doivent cependant être approfondies.

### **3 Phénotype et caractéristiques des cellules sénescences**

Le phénotype de sénescence est associé à une multitude de marqueurs et caractéristiques. Le plus important est l'arrêt de croissance observé dans tous les types de sénescence. Bien que cet arrêt du cycle cellulaire s'effectue habituellement en phase G1 [69], certains cas d'arrêt du cycle à la transition G2/M furent rapportés [70]. Suite à leur entrée en sénescence, les cellules deviennent réfractaires aux signaux mitogéniques [71, 72]. L'arrêt de prolifération causé par la sénescence est donc considéré comme irréversible puisque les facteurs de croissance ne peuvent stimuler la division de ces cellules (revue dans [73]), lesquelles demeurent pourtant métaboliquement actives pendant de longues périodes de temps (revue dans [74]). De plus, les cellules sénescences sont incapables

d'induire l'expression de l'ARNm de *c-fos* suite à une stimulation par le sérum [75]. Ces données suggèrent que les cellules sénescents deviennent insensibles aux facteurs mitogéniques.

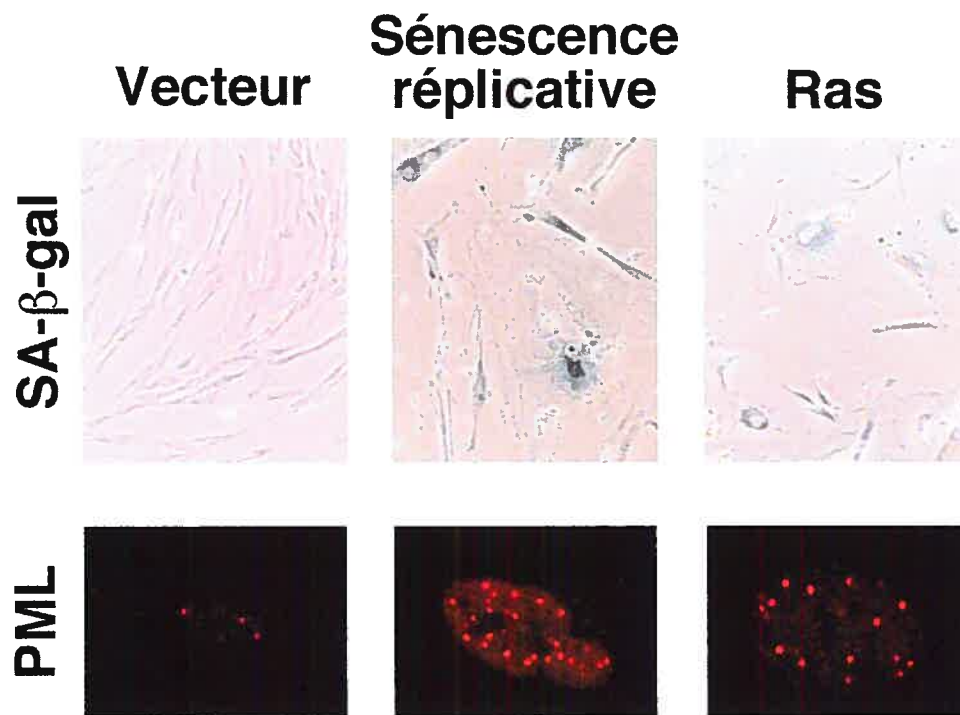
Lorsque les cellules normales entrent en sénescence, elles changent progressivement de morphologie. Tout d'abord, les cellules sénescents sont plus grosses, acquièrent une morphologie aplatie, présentent des anomalies nucléaires et leurs nucléoles deviennent proéminents (Figure 2). L'acquisition de la morphologie aplatie est associée à l'activation par Rb de Cdk5 qui augmente les niveaux d'ezrin, protéine associée à la membrane et au cytosquelette [76, 77].

Toutefois, le marqueur biochimique le plus couramment utilisé provient de la découverte, faite par l'équipe de Judith Campisi, d'une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ -gal) (Figure 2) [78]. La  $\beta$ -galactosidase est une enzyme lysosomale normalement active à pH 4, mais également active à pH 6 chez les cellules sénescents. Le pourcentage de cellules possédant l'activité SA- $\beta$ -gal augmentent *in vitro* en fonction du nombre de doublements et *in vivo* avec l'âge [78]. Des études ont démontré que le nombre et la taille des lysosomes augmentent chez les cellules sénescents [79, 80]. L'activité SA- $\beta$ -gal semble donc être causée par l'augmentation de l'activité lysosomale à un pH suboptimal qui devient détectable chez les cellules sénescents due à la hausse du contenu lysosomal [81]. En fait, il a récemment été démontré que l'activité SA- $\beta$ -gal est le résultat de la  $\beta$ -galactosidase lysosomale encodée par *GLBI* et n'est pas requise à l'entrée en sénescence [82].

De plus, les niveaux d'expression de nombreux gènes changent durant la sénescence [83, 84]. En fait, l'introduction par micro-injection d'ARNm provenant de cellules sénescents dans des cellules jeunes cause l'entrée en sénescence [85]. Ces données supportent le fait que la sénescence est le résultat d'un programme génétique impliquant des changements de l'expression génique. Quelques uns des gènes considérés comme marqueurs communs de la sénescence sont PAI-1 [86-88], stromelysin [89],

**Figure 2. Phénotype des cellules sénescences.** Apparition de l'activité SA- $\beta$ -gal et des corps nucléaires PML lors de la sénescence répllicative et de la sénescence induite par l'oncogène Ras. Les fibroblastes diploïdes humains IMR90 exhibent normalement une morphologie filiforme. Toutefois, lorsque ces cellules entrent en sénescence répllicative ou induite par l'oncogène Ras, elles adoptent une morphologie aplatie. Images tirées de [90].

Figure 2



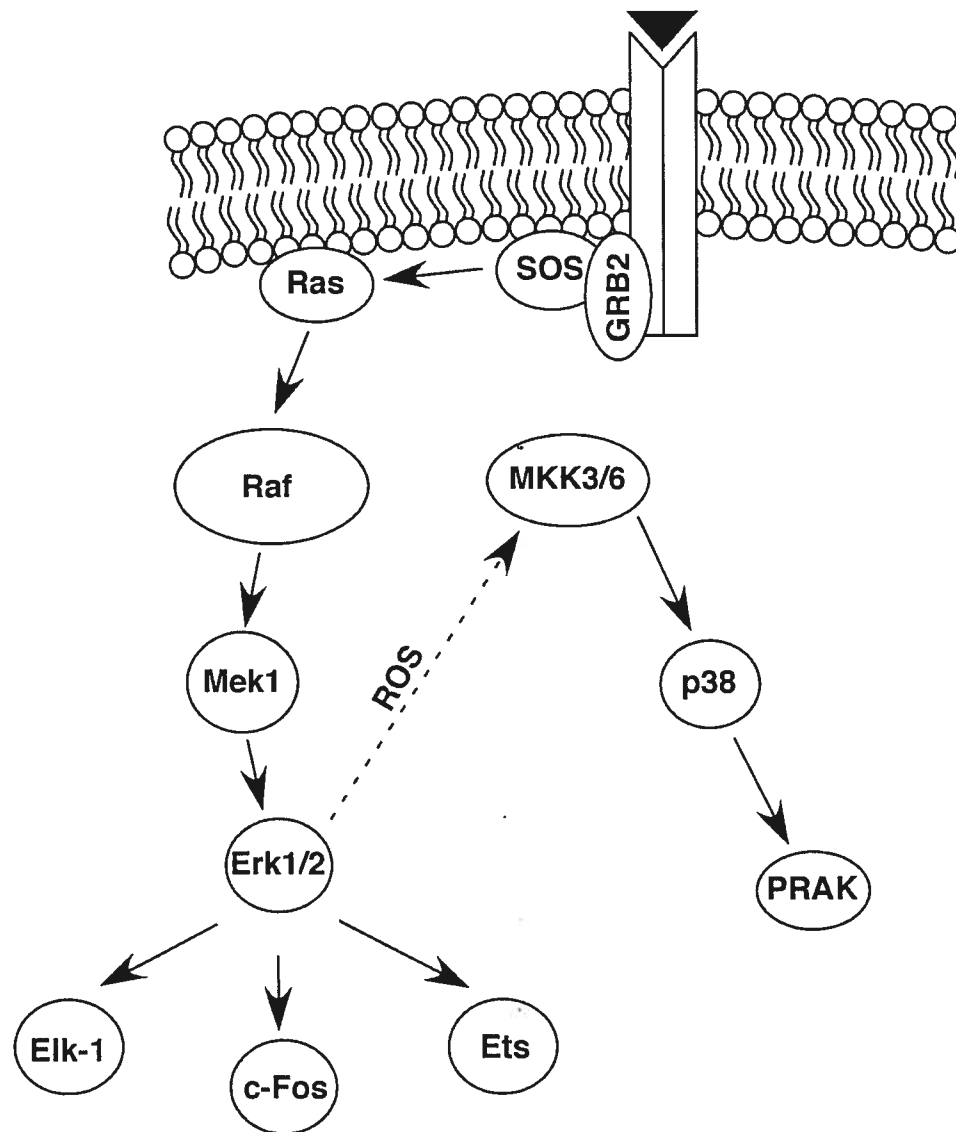


apolipoprotéine J [91] et PML [90]. Les corps nucléaires PML constituent d'ailleurs d'excellents marqueurs de sénescence (Figure 2). De plus, les cellules sénescents démontrent une augmentation de l'activité de la collagénase et de la métalloprotéinase MMP-3 qui peuvent dégrader la matrice extracellulaire [92-94].

## 4 La sénescence prématurée

Le raccourcissement des télomères ne constitue pas l'unique stress induisant le phénotype de sénescence puisque certains types cellulaires ne sont pas immortalisés suite à l'expression de la télomérase [95]. De plus, bien que les cellules de souris expriment la télomérase et maintiennent de longs télomères, elles entrent en sénescence *in vitro*. Il est donc clair qu'il existe également un mécanisme de sénescence indépendant des télomères. En fait, de nombreux stress peuvent induire de façon précoce l'arrêt de prolifération associé à la sénescence. On nomme ce type d'arrêt de prolifération sénescence prématurée puisqu'il survient bien avant la sénescence réplivative. L'apparition de la sénescence prématurée peut être déclenchée par divers stimuli dont les conditions de culture, divers médicaments, des agents endommageant l'ADN, la dysfonction des télomères (Voir section *Est-ce le raccourcissement ou la dysfonction des télomères qui induit la sénescence réplivative ?*) et l'expression de certains oncogènes. Puisque ce phénotype peut être déclenché suite à l'exposition à différents stress, il fut suggéré que la sénescence constituait une réponse générale aux dommages cellulaires. Dans ce sens, il est possible de comparer la sénescence à l'apoptose qui est elle aussi déclenchée par différents stress et implique un patron spécifique d'expression génique.

**Figure 2a. Voies de signalisation déclenchées par l'activation de Ras.** L'activation de Ras conduit à la stimulation d'une cascade d'événements de phosphorylation impliquant Raf, Mek et Erk. L'activation subséquente de la voie de MKK3/6-p38-PRAK est ensuite déclenchée par l'augmentation des niveaux intracellulaires de ROS induite par l'activation de la voie Ras-Raf-Mek-Erk. L'activation de ces voies mène ultimement à l'induction de la sénescence.

**Figure 2a**

## 4.1 Sénescence prématurée induite par les oncogènes

### 4.1.1 Le modèle classique : La sénescence induite par Ras

L'activation d'un oncogène constitue une étape importante lors de l'initiation de la transformation. Toutefois, l'expression d'un oncogène déclenche une sénescence prématurée chez les cellules normales. Le premier oncogène identifié pour sa capacité à causer la sénescence est Ras<sup>V12</sup> [96]. La sénescence induite par Ras ne peut être contournée par l'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase hTERT, suggérant que Ras induit un programme distinct de la sénescence répllicative et indépendant des télomères [97]. La famille de proto-oncogènes Ras regroupe de petites protéines liant le GTP qui propagent les signaux mitogéniques provenant de récepteurs à la surface membranaire. L'activation aberrante de Ras constitue un événement important du processus de transformation (voir section *Transformation cellulaire et cancer*) et est associée à diverses tumeurs [98]. L'activation de Ras déclenche une cascade d'activation par phosphorylation de protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) (Figure 2a). Ras active Raf qui par après phosphoryle MEK1/2. Ensuite, l'activité kinase de MEK1/2 modifie et active ERK1/2. À l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, il a été démontré que la sénescence induite par Ras dépend de l'activation de MEK1/2 [99]. L'expression de formes constitutivement activées de Raf, MEK et Ets cause l'apparition prématurée des marqueurs de sénescence [99-101] tout comme l'expression de Mos qui, comme Ras, active la voie des MAPKs [102].

L'activation de Ras n'aboutit pas seulement à l'activation de ERK, mais stimule également la MAPK p38 [103]. La MAPK p38 est phosphorylée et activée par MKK3 et MKK6 suite à des signaux non-mitogéniques tels certaines cytokines pro-inflammatoires et des stress environnementaux [104]. L'expression de Ras dans des fibroblastes normaux mène à l'activation séquentielle de la voie de MEK-ERK puis de celle de MKK3/6-p38

[105, 106]. De plus, l'inhibition de p38 par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou de dominants négatifs de p38 et MKK3 permet de contourner la sénescence induite par Ras et MEK1 [106, 107]. L'activation constitutive de p38 par l'utilisation de formes mutées activées de MKK3 ou MKK6 est suffisante à l'entrée prématurée en sénescence. Récemment, il a été démontré que PRAK cause la sénescence suite à l'activation de p38 en réponse à la forme oncogénique de Ras. L'inactivation de la kinase PRAK compromet la sénescence et promeut la transformation cellulaire [108].

Outre les voies de MEK-ERK et de MKK3/6-p38, l'axe MKK7-JNK est également impliqué dans la sénescence. Dans ce cas-ci, la perte d'expression de MKK7 bloque la progression G2/M et cause la sénescence [70]. Puisque Ras active également la voie de JNK, il est difficile d'intégrer ces données au modèle actuel de la sénescence induite par Ras.

#### **4.1.2 Autres oncogènes causant la sénescence prématurée**

En plus de la voie de Ras et des MAPKs, plusieurs oncogènes ont été répertoriés pour leur capacité à induire le phénotype de sénescence. Les protéines Cdc6 et cycline E impliquées dans la réplication de l'ADN [102], l'oncogène  $\beta$ -caténine [109], l'inhibiteur de l'apoptose Bcl-2 [110] et le régulateur du cycle cellulaire E2F1 [111] causent l'entrée en sénescence prématurée. De plus, l'expression de Myc en absence de la protéine WRN induit aussi la sénescence. L'activation de Akt stimule la prolifération et la survie cellulaire promouvant ainsi la tumorigenèse [112]. Toutefois, les cellules normales entrent en sénescence suite à l'activation constitutive de Akt afin de freiner leur prolifération [113, 114]. De façon surprenante, l'inactivation de la voie de Akt mène également à la sénescence. L'inhibition de la PI(3)K ou l'expression de PTEN conduit à l'apparition des marqueurs de sénescence [115, 116].

#### 4.1.3 La voie de signalisation de JAK-STAT et l'oncogène STAT5

La famille des STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) compte 7 membres (STAT1-4, 5A, 5B et 6) comportant entre 750 et 900 acides aminés. Les STATs possèdent plusieurs domaines conservés dont un domaine *coiled-coil*, un domaine de liaison à l'ADN, un domaine SH2 jouant un rôle important dans le recrutement au récepteur et lors de la dimérisation, ainsi qu'un domaine de transactivation impliqué dans le recrutement de régulateurs transcriptionnels.

Les STATs jouent un rôle primordial lors de la transduction du signal déclenché par de nombreuses cytokines impliquées dans différents processus cellulaires (Figure 2b).

Les gènes *STAT5A* et *STAT5B* sont encodés par deux gènes récemment dupliqués et organisés en tandem. Des études génétiques et biochimiques ont permis de démontrer que STAT5A et STAT5B sont responsables de la réponse induite par l'interleukine-2 (IL-2), IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15, GM-CSF, EPO, Prl et GH. Bien que STAT5A et STAT5B partagent une forte homologie, ces deux protéines possèdent des rôles différents au niveau tissulaire. La suppression de *STAT5A* chez la souris cause un défaut du développement de la glande mammaire [660], tandis que l'ablation de *STAT5B* mène à des problèmes de croissance [661]. La perte combinée de STAT5A et STAT5B cause quant à elle des défauts de développement des cellules lymphoïdes menant à une immuno-déficience sévère [662].

En plus de la voie des MAPKs, celle impliquant les STATs constitue également une voie oncogénique. Tout d'abord, l'activation constitutive de la protéine STAT5 fut observée dans de nombreux cancers dont plusieurs types de leucémies [595-597], le cancer de la prostate [598, 599], du sein [600, 601] et de la tête et du cou [602]. L'activation constitutive de la protéine STAT5 est habituellement causée par des kinases oncogéniques. Parmi ces kinases, on retrouve le produit de translocation chromosomique Tel/Jak2 [663,

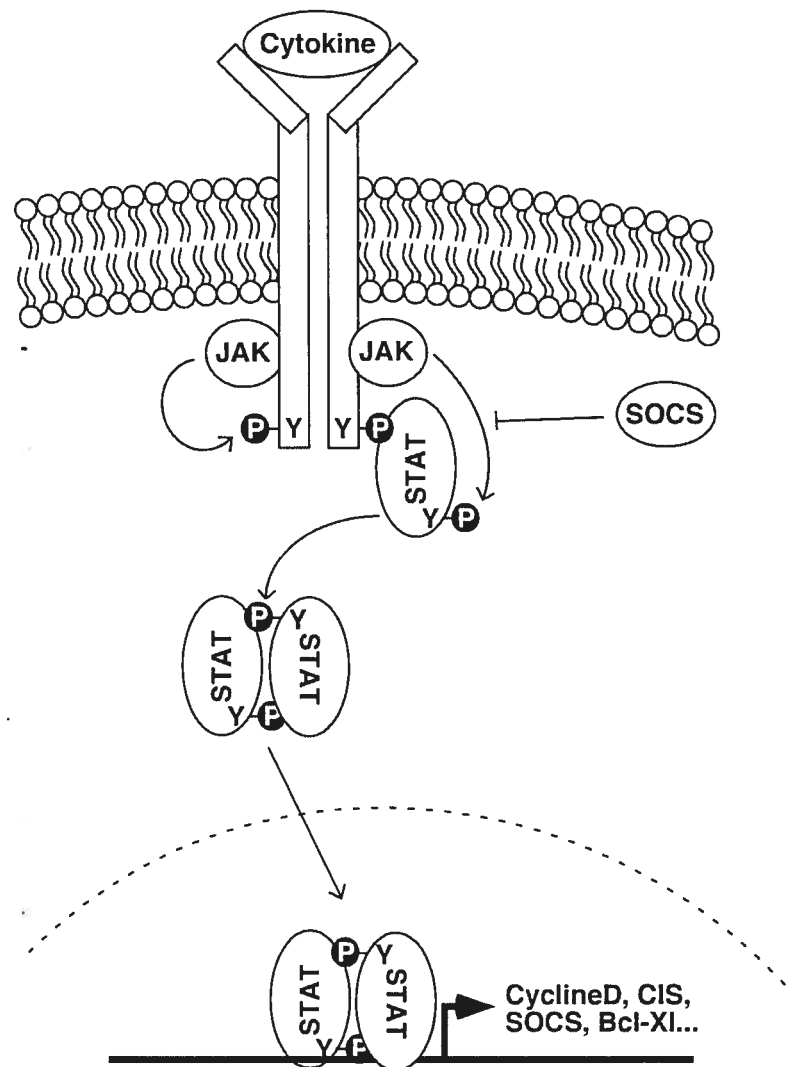
664] ainsi que la protéine de fusion oncogénique Bcr/Abl [665]. D'ailleurs, l'inactivation de STAT5 bloque la transformation induite par Tel/Jak2 [666] et Bcr/Abl [667, 668]. De plus, l'expression de mutants constitutivement activés de STAT5 induit certains aspects de la transformation cellulaire dont la prolifération en absence de facteurs de croissance [669]. Finalement, l'activation incontrôlée de STAT5 promeut la formation de tumeurs via l'induction de gènes impliqués dans la régulation de la survie et du cycle cellulaire. Parmi ces gènes, on retrouve Bcl-XL, membre de la famille de protéines anti-apoptotiques comprenant Bcl-2 [603]. L'expression de Bcl-XL empêche la relâche du cytochrome c de la mitochondrie, événement requis lors de l'apoptose afin de stimuler l'activation d'APAF1 et le clivage de la pro-caspase 9. De plus, l'expression de la cycline D1, qui contrôle la progression G1-S du cycle cellulaire lorsqu'associée à Cdk4 ou Cdk6, est également régulée par STAT5 [603, 670, 671].

Réunies, ces données suggèrent que STAT5 représente un médiateur critique du signal oncogénique et que l'activation constitutive de STAT5 participe à la formation de tumeurs.

**Figure 2b. La voie de signalisation de JAK-STAT.** Suite à la liaison d'une cytokine à son récepteur, JAK s'active et phosphoryle le récepteur. Le recrutement des STATs s'effectue alors via leur domaine SH2 liant les tyrosines phosphorylées du récepteur. Se trouvant à proximité de JAK, les STATs sont stimulés suite à la phosphorylation par JAK. Les STATs activés sont alors relâchés afin de former des dimères qui lient des éléments de réponse spécifiques de l'ADN pour finalement activer la transcription de nombreux gènes cibles.



Figure 2b



## **4.2 Sénescence, choc de culture et stress oxydatif**

### **4.2.1 Conditions inappropriées de culture des cellules normales**

La plupart des cellules de mammifères ne prolifèrent pas indéfiniment et entrent en sénescence répllicative. Chez les cellules humaines, la sénescence répllicative est causée par le raccourcissement progressif des télomères, mais les cellules de souris entrent en sénescence en culture malgré leurs longs télomères [117]. Plutôt que d'entrer en sénescence répllicative, les MEFs subissent un choc des conditions de culture causé par des pratiques inadéquates de culture. La complexité et la nature indéfinie du sérum contenu dans les milieux de culture contribuent à ce choc de culture. La propagation de cellules primaires humaines et murines dans un milieu où le sérum est remplacé par différents facteurs définis, rend les cellules pratiquement immortelles [118-120]. De plus, l'exposition des MEFs à des niveaux non-physiologiques d'oxygène (20% O<sub>2</sub>) réduit leur capacité proliférative. En fait, la culture de MEFs et de cellules humaines à des niveaux physiologiques d'oxygène, soit 3%, prolonge la longévité des cellules et dans certains cas permet le contournement de la sénescence [121-124]. L'entrée prématurée en sénescence de MEFs déficients en différents facteurs impliqués lors de la réparation de l'ADN suggère que le dommage à l'ADN limite la prolifération de ce type cellulaire. Les MEFs accumulent beaucoup plus de dommages à l'ADN lorsque cultivés sous 20% d'oxygène plutôt qu'à 3% d'oxygène, et également plus de dommages que des cellules humaines poussant sous 20% d'oxygène [121].

### **4.2.2 Endommagement de l'ADN: inducteur de la sénescence**

Conséquemment, il est possible d'induire une sénescence prématurée dans différents types cellulaires normaux ou provenant de cancers lorsque l'on traite les cellules avec différents agents induisant des bris au niveau de l'ADN tels le peroxyde d'hydrogène [125], les rayonnements UV [126, 127] et gamma [128], la doxorubicine [129-131], la cisplatine [132], la bléomycine [133], l'actinomycine D (faible dose) [133] et

l'hydroxyurée [134, 135]. Le phénotype de sénescence induit par certaines de ces drogues ne peut être contourné par l'expression de la télomérase [131]. Ces données indiquent clairement que l'activation de la voie de réponse de dommage à l'ADN permet d'activer le programme de sénescence.

Les espèces oxygénées réactives (ROS) générées par la chaîne respiratoire mitochondriale représentent une source importante de dommage oxydatif pouvant causer des modifications aux acides nucléiques ainsi que des bris simple et double brin de l'ADN. Or, les sénescences prématurées induites par Ras dans les cellules normales et par p21 dans les cellules cancéreuses causent l'accumulation intracellulaire de ROS [136, 137]. Cette production de ROS induite par Ras est causée par l'augmentation de l'activité de la 5-lipoxygénase qui est d'ailleurs suffisante au déclenchement du processus de sénescence [138]. La réduction des niveaux de ROS par traitement à la N-acétylcystéine (NAC) ou par l'expression de la superoxide dismutase 1 (SOD1), qui détoxifie l'anion superoxide, abolit la sénescence induite par Ras [137]. De plus, la déplétion de SOD1 dans les cellules normales déclenche l'apparition des marqueurs de sénescence permettant de croire que SOD1 protège la cellule contre le stress oxydatif [139]. Le stress oxydatif généré lors de l'expression de Ras représente un événement crucial à l'activation de p53 par ATM et requiert Seladin-1 afin de permettre l'accumulation de p53 [140]. Seladin-1, protéine également impliquée dans le métabolisme du cholestérol, est activée par les ROS et lie la partie N-terminale de p53 afin d'empêcher la liaison de Mdm2 [140].

Bien que le stress oxydatif et les drogues endommageant l'ADN déclenchent le phénotype de sénescence, le rôle de la voie de réponse au dommage à l'ADN lors de la sénescence induite par les oncogènes demeurerait jusqu'à tout récemment incertain.

## **5 Voies de suppression tumorale impliquées lors de la sénescence**

L'étude des modèles de sénescence répllicative et de sénescence prématurée par Ras, principalement, a permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués lors du programme de sénescence. Deux voies principales de suppression

tumorale sont responsables de l'établissement de la sénescence, soit les voies de p53 et de Rb. À celles-ci, s'ajoute la voie de réponse/réparation du dommage à l'ADN située en amont de p53 et Rb. De plus, le suppresseur tumoral PML sera également étudié puisqu'il constitue un facteur important de la sénescence et des voies de p53 et Rb.

## 5.1 Le suppresseur tumoral p53

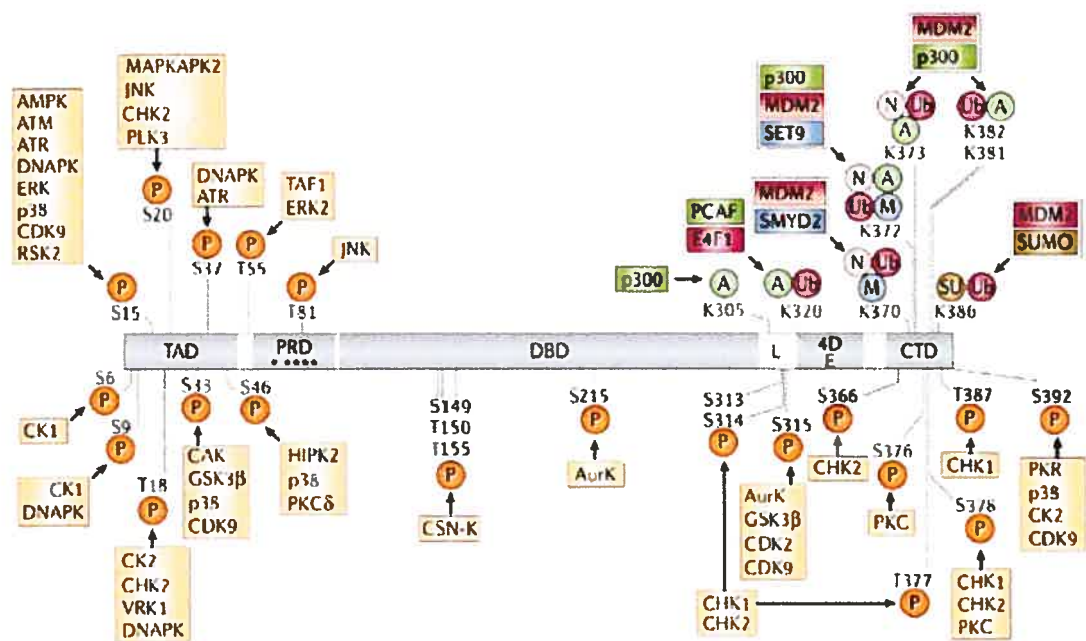
Le produit du gène *p53* représente un important suppresseur tumoral inactivé par délétion ou mutation dans approximativement 50% de tous les cancers humains [141]. De plus, des mutations de p53 sont retrouvées chez les patients atteints du syndrome Li-Fraumeni caractérisé par une forte prédisposition au cancer [142, 143]. Le gène *p53* humain encode pour au moins 9 isoformes générées par épissage alternatif et par l'utilisation d'un site alternatif d'initiation de la transcription dans l'intron 4 [144]. La protéine p53 est un facteur de transcription liant l'ADN et induisant l'expression de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération, la réparation de l'ADN et l'apoptose. Les niveaux protéiques de p53 subissent un contrôle serré dans la cellule non-stimulée, mais la protéine est rapidement induite et activée de façon post-traductionnelle par différentes voies de signalisation. De nombreux stress dont le dommage à l'ADN, le stress oxydatif et l'activation d'oncogènes peuvent activer p53.

### 5.1.1 Modifications post-traductionnelles de p53

p53 est une protéine modulaire contenant un domaine de transactivation N-terminal, un domaine riche en prolines, un vaste domaine de liaison à l'ADN [145], un domaine de tétramérisation [146, 147] ainsi qu'un domaine de régulation C-terminal (Figure 3). La séquence primaire de p53 contient de nombreux résidus sérine, thréonine et lysine conservés jouant un rôle important dans la régulation de la protéine. La régulation post-traductionnelle de p53 étant plus que complexe, un survol des modifications de p53 observées lors de la sénescence est présenté ci-dessous.

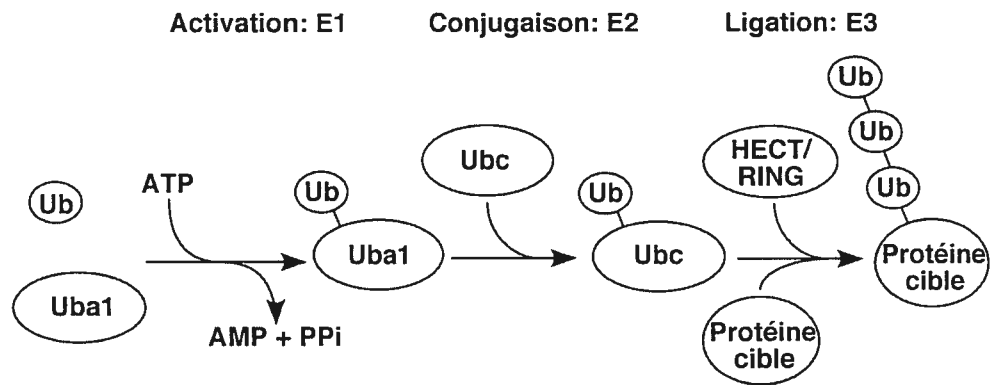
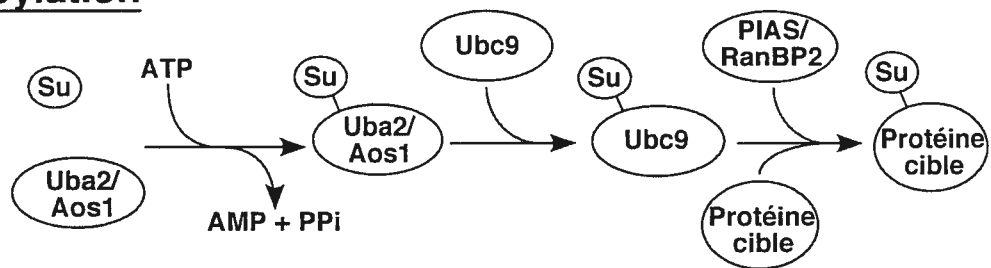
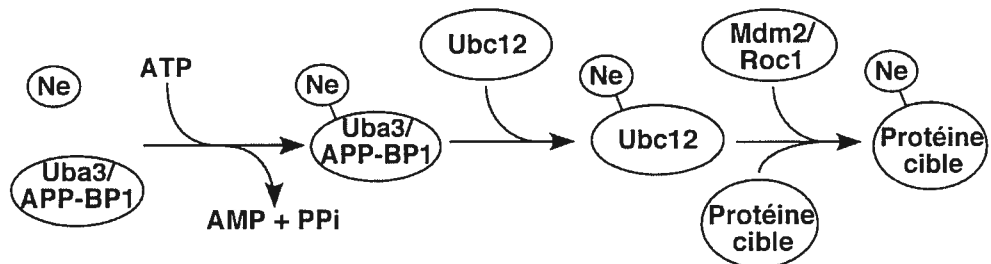
**Figure 3. Schéma des différents domaines et des modifications post-traductionnelles de p53.** Les différents domaines de p53 sont le domaine de transactivation (TAD), le domaine riche en prolines (PRD), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine de tétramérisation (4D) ainsi que le domaine de régulation C-terminal (CTD). Les résidus modifiés sont montrés avec les sites de phosphorylation (P) en orange, acétylation (A) en vert, ubiquitination (Ub) en violet, neddylation (N) en rose, méthylation (M) en bleu et sumoylation en brun (SU). Tiré de [148].

Figure 3



**Figure 3a. Processus de modification des protéines par ubiquitination, sumoylation et neddylation.** L'ubiquitine est le membre fondateur d'une famille de protéines dont font partie SUMO et NEDD8. Parmi les membres de cette famille, la protéine NEDD8 est celle partageant la plus grande homologie avec l'ubiquitine. La conjugaison d'un groupement NEDD8, phénomène nommé neddylation, constitue un processus similaire à l'ubiquitination. Tout comme lors de l'ubiquitination, le groupement NEDD8 est activé et transféré à son substrat grâce à des enzymes de type E1 (APP-BP1 et Uba3) et E2 (Ubc12). La fonction de l'ubiquitination et de la neddylation est principalement liée à la dégradation protéique, tandis que la sumoylation est impliquée dans la formation d'interactions protéiques.

Figure 3a

UbiquitinationSumoylationNeddylation



### 5.1.1.1 Phosphorylation de p53

La protéine p53 humaine possède 23 sites différents de phosphorylation (Figure 3). La régulation de p53 par phosphorylation est donc complexe et survient sur plusieurs sites dont la majorité sont situés à l'extérieur du domaine de liaison à l'ADN. La plupart des sites de phosphorylation peuvent être modifiés par plus d'une kinase en réponse à différents stress. Un mécanisme simplifié d'activation peut être proposé. Suite à un stress, la protéine p53 est phosphorylée en sérine 15 et 20 dans la portion N-terminale contenant le domaine de transactivation. Cette région comprend un site important de liaison à Mdm2 [149]. La phosphorylation additionnelle en thréonine 18 altère la structure de l'hélice  $\alpha$  avec laquelle Mdm2 interagit et réduit la liaison de p53 à Mdm2 [150]. De plus, la phosphorylation de motifs sérine/thréonine permet la liaison de la prolyl-isomérase PIN1 afin d'induire l'isomérisation cis-trans de groupements prolyl à l'intérieur du domaine riche en prolines [151, 152]. Ensemble, ces modifications et changements conformationnels pourraient alors réduire l'affinité de p53 pour Mdm2 et permettre l'association de co-activateurs, tels les acétyltransférases p300 et CBP [153-156].

Lors de la sénescence répliquative, plusieurs des modifications par phosphorylation de p53 chevauchent des sites habituellement ciblés suite au dommage de l'ADN [157]. Par exemple, la sérine 15 et la thréonine 18 sont phosphorylées lors de la sénescence répliquative. Lors de la sénescence induite par Ras, la sérine 15 se retrouve également modifiée par phosphorylation par ATM bien que p38 pourrait contribuer à cette modification [102, 158]. De plus, l'activation de la kinase PRAK par p38 lors de la sénescence par Ras mène à la phosphorylation en sérine 37 de p53 [108], aussi ciblée par ATR et DNA-PK en réponse au dommage de l'ADN [159, 160].

### 5.1.1.2 Modification des lysines

Les lysines de p53 situées dans la portion C-terminale peuvent être modifiées par méthylation, sumoylation, neddylation et ubiquitination (Figure 3-3a). Puisque la plupart de

ces lysines sont la cible de plusieurs différentes modifications, ce domaine de p53 forme un réseau complexe de modifications activatrices et inhibitrices entrant en compétition.

#### ***5.1.1.2.1 Acétylation de p53***

L'acétylation de lysines situées en C-terminal permet l'activation de p53 en stimulant sa capacité à lier l'ADN [161] et en inhibant l'ubiquitination causée par Mdm2 [162]. Les lysines 305, 372, 373, 381 et 382 sont acétylées par p300 [163] tandis que la lysine 320 est modifiée par PCAF [164]. Lors de la sénescence induite par Ras et la sénescence répllicative, la protéine p53 est acétylée en lysine 382 ce qui augmente son activité [165].

#### ***5.1.1.2.2 Ubiquitination et dégradation de p53***

La protéine p53 est régulée au niveau de sa stabilité protéique qui est d'ailleurs déterminée par son partenaire d'interaction Mdm2 (Mouse double minute 2 ou Hdm2 pour l'orthologue humain). Les souris déficientes pour Mdm2 meurent précocement durant l'embryogenèse. Toutefois, ce phénotype létal peut être supprimé par l'inactivation simultanée de p53, suggérant que l'activité principale de Mdm2 est de réguler p53 [166, 167]. Par ailleurs, il avait été démontré que Mdm2 bloquait l'activité transcriptionnelle de p53 [168]. Au niveau moléculaire, Mdm2 induit la dégradation de p53 [169, 170] grâce à son activité ubiquitine E3 ligase qui la cible [171, 172]. Le mécanisme d'ubiquitination comprend une série de réactions enzymatiques catalysées par des enzymes de type E1, E2 et E3 spécifiques au transfert de groupements ubiquitines. L'addition de molécules d'ubiquitine à une protéine cible représente un signe de reconnaissance et de ciblage vers la dégradation par le protéasome 26S. L'ubiquitination de p53 fut initialement découverte chez les cellules infectées par le virus du papillome humain où l'activité E3 ligase de la protéine associée à E6 (E6-AP) fut identifiée [173].

De nombreuses études montrent que l'activité ubiquitine ligase de Mdm2 attribuée à son domaine RING est essentielle pour causer la dégradation et l'export nucléaire de p53 [174-176]. De plus, la mono-ubiquitination par Mdm2 semble induire l'export nucléaire de

p53 tandis que des niveaux élevés de Mdm2 promeuvent la poly-ubiquitination de p53 et sa dégradation [177]. Mdm2 permet également le transfert de groupements semblables à l'ubiquitine comme NEDD8, aux lysines C-terminales de p53 réduisant ainsi son activité transcriptionnelle [178]. Une protéine similaire à Mdm2 nommée MdmX (Mdm4) régule également de façon négative p53 [179-181]. Outre Mdm2, quelques autres ligases de groupements ubiquitines possèdent la capacité de modifier et de dégrader p53 telles que COP1 [182], Pirh2 [183] et ARF-BP1 [184]. Puisque les gènes encodant Mdm2 [185], COP1 [182] et Pirh2 [183] représentent des cibles transcriptionnelles de p53, une boucle de contrôle par inhibition permet la régulation de l'activité de p53.

### **5.1.2 Régulation des niveaux de p53 par la modulation de l'activité de Mdm2**

Les facteurs contrôlant l'interaction entre p53 et Mdm2 ou l'activité de Mdm2 permettent donc de déterminer les niveaux de p53. Jusqu'à maintenant, de nombreuses modifications post-traductionnelles de p53 permettent de réguler la stabilité de p53 en contrôlant l'interaction entre p53 et Mdm2. De plus, certaines protéines servent de cofacteurs essentiels à l'ubiquitination déclenchée par Mdm2. Par exemple, YY1 [186] et gankyrin [187] lient Mdm2 augmentant ainsi la dégradation de p53. L'ubiquitine ligase pVHL quant à elle lie p53 et bloque l'ubiquitination de p53 causée par Mdm2 [188]. De plus, ING1, dont les niveaux augmentent durant la sénescence, lie Mdm2 et promeut l'activité transcriptionnelle de p53 [189, 190].

### **5.1.3 L'axe ARF-p53**

La protéine ARF, produit du locus *INK4b/ARF/INK4a*, bloque la croissance cellulaire aberrante en partie via l'activation de la voie de p53. L'induction de p53 par ARF semble provoquée par l'inactivation de Mdm2 puisque ARF interagit directement avec Mdm2 et inhibe sa capacité à ubiquitiner p53 [191-194]. Les mécanismes par lesquels ARF module la voie p53-Mdm2 sont cependant complexes. Tout d'abord, ARF est majoritairement localisé au nucléole et y séquestre Mdm2 afin de stabiliser p53 situé au

nucléoplasme [195]. D'un autre côté, les formes nucléoplasmiques de ARF peuvent également activer la fonction de p53 [196, 197] en inhibant directement l'activité enzymatique de Mdm2 [198, 199]. ARF peut aussi lier YY1 et briser l'interaction Hdm2-YY1 qui est importante pour l'ubiquitination de p53 provoquée par Hdm2 [186].

Mdm2 ne constitue pas l'unique cible de ARF, car ARF inhibe également l'ubiquitination de p53 opérée par ARF-BP1 [184].

#### **5.1.4 L'implication du nucléole dans l'activation de p53**

En plus, de permettre la séquestration de Mdm2 par ARF, le nucléole semble représenter un site crucial contribuant à la régulation de p53. La nucléophosmine (NPM/B23) est une phosphoprotéine nucléolaire participant à l'assemblage des ribosomes [200] et faisant continuellement la navette entre le noyau et le cytoplasme [201]. NPM s'associe avec ARF à l'intérieur de larges complexes nucléolaires [202] et stabilise ARF en retardant sa dégradation [203, 204]. La stabilité de la protéine ARF est grandement augmentée en présence de niveaux élevés de NPM, tandis que la déplétion de NPM par l'utilisation d'un shRNA déstabilise ARF. Toutefois, il fut également démontré que la surexpression de NPM séquestre ARF au nucléole [205] restreignant ainsi son activité inhibitrice sur Mdm2 qui peut avoir lieu au nucléoplasme [197].

Un lien fonctionnel existe entre l'intégrité du nucléole et la stabilisation de p53, car plusieurs stress cellulaires affectent l'intégrité nucléolaire et activent p53 [205]. NPM subit alors une redistribution nucléoplasmique et pourrait donc stabiliser p53. NPM interagit directement avec p53, permet l'activation transcriptionnelle de p53 et provoque l'entrée précoce en sénescence de façon dépendante de p53 [206]. Plus récemment, il fut démontré que NPM interagit avec Hdm2 et protège p53 de la dégradation causée par Hdm2 [207]. Outre ARF et NPM, d'autres protéines nucléolaires régulent l'activité de p53. Les protéines ribosomiques L11 et L23 permettent l'inhibition et le recrutement de Mdm2 au nucléole stabilisant ainsi p53 [208, 209].

Ces données indiquent que le nucléole et NPM constituent des régulateurs importants de l'activité de p53.

#### **5.1.5 Régulation transcriptionnelle des niveaux de p53**

Bien que les modifications post-traductionnelles semblent représenter le mécanisme majeur de régulation des niveaux de la protéine p53, le contrôle de p53 peut également s'effectuer de façon transcriptionnelle. Par exemple, le répresseur transcriptionnel BCL6 réprime l'expression de p53 en liant deux sites spécifiques au niveau du promoteur du gène de *p53*. La suppression de l'expression de BCL6 par l'utilisation d'un shRNA permet d'augmenter les niveaux d'ARNm et protéiques de p53 [210]. De plus, le criblage d'une banque rétrovirale d'ADNc permettant de contourner la sénescence a permis d'identifier BCL6 comme un inhibiteur des signaux anti-prolifératifs déclenchés par p53 [211]. Cette stratégie de criblage a également permis la découverte du répresseur transcriptionnel KLF4 qui bloque aussi l'expression de p53 en liant directement son promoteur [212].

#### **5.1.6 Cibles transcriptionnelles de p53 potentiellement responsables de l'arrêt de croissance et de la sénescence**

La protéine p53 représente un important suppresseur tumoral permettant de déclencher l'apoptose ou la sénescence suite à différents stress oncogéniques. La réintroduction de p53 dans les cellules tumorales peut alors causer l'apoptose [213] et/ou la sénescence [214]. *In vivo*, la restauration de p53 à l'intérieur de tumeurs induit la régression tumorale par l'activation des programmes d'apoptose et de sénescence [215-217]. Le rétablissement de la fonction de p53 dans les tumeurs par de petites molécules (comme Nutlin, un antagoniste de Mdm2) constitue également une cible thérapeutique attrayante [218]. De nombreuses études menées chez l'humain et la souris suggèrent que p53 joue un rôle critique lors des sénescences répllicative et prématurée [96, 99, 111, 219-221].

De nombreux gènes sont sous le contrôle de p53. Par exemple, l'activation de p53 suite au dommage de l'ADN mène à la répression de *Cdc25C* [222] et ainsi qu'à l'activation de *Gadd45a* [223], de *14-3-3 $\sigma$*  [224] et de *reprimin* [225] afin de freiner la progression du cycle cellulaire. Plusieurs gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose sont des cibles transcriptionnelles de p53. Par exemple, les gènes *PIG3* [226], *bax* [227], *puma* et *noxa* [228] sont induits suite à l'activation de p53 afin d'induire l'apoptose. En fait, l'analyse du profil d'expression généré suite à l'activation de p53 suggère que de nombreux gènes impliqués dans différentes réponses cellulaires sont ciblés par p53 [229].

Le suppresseur tumoral p53 ainsi que certaines de ses cibles transcriptionnelles jouent un rôle majeur lors de la sénescence. En fait, quatre gènes cibles de p53 sont fortement impliqués lors de ce phénomène. D'ailleurs, leur expression est suffisante pour causer l'entrée en sénescence.

#### 5.1.6.1 miR-34

Tout récemment, il fut démontré que le réseau de suppression tumorale provoqué par p53 implique des miRNAs. Les miRNAs de la famille miR-34 sont des cibles transcriptionnelles directes de p53 dont l'induction suite au dommage à l'ADN ou le stress oncogénique dépend de p53 [230]. miR-34 contrôle la progression du cycle cellulaire en réprimant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération dont CDK4 et cycline E [230]. De plus, l'expression de miR-34 déclenche la sénescence dans les cellules normales [230]. Ce miRNA pourrait donc avoir un rôle lors de la sénescence induite par les oncogènes.

#### 5.1.6.2 p21

Afin de déterminer les régulateurs de la synthèse de l'ADN dans les cellules sénescents, un essai fonctionnel de réplication de l'ADN fut effectué par transfection et micro-injection d'ADNc isolés de cellules sénescents [231, 232]. Cette approche a permis

d'identifier trois clones, nommés SDI-1 à 3 (*senescent cell derived inhibition of DNA synthesis 1-3*) inhibant la synthèse de l'ADN. SDI-2 et 3 exhibaient des niveaux d'ARNm équivalents entre les cellules jeunes et sénescents tandis que les niveaux de SDI-1 étaient plus élevés chez les cellules sénescents. Puis il fut démontré que SDI-1 est un inhibiteur de plusieurs complexes cycline/CDK, inductible par p53 et aussi nommé Cip1, Waf1, Pic1 ou p21 [233, 234]. p21 contrôle donc le cycle cellulaire en régulant l'activité de différents complexes cycline/CDK et en inhibant la phosphorylation de Rb par ces complexes [234, 235]. La liaison d'une molécule de p21 au complexe cycline/CDK permet l'assemblage du complexe tandis que la liaison de plusieurs molécules de p21 inhibe l'activité kinase du complexe [236, 237].

Puisqu'une des fonctions les mieux caractérisées de p21 est l'inhibition de la prolifération cellulaire, ces niveaux devraient être régulés lors de la sénescence. Or, les niveaux d'expression de p21 atteignent un maximum lorsque les cellules perdent leur potentiel de prolifération puis diminuent. Parallèlement, les niveaux de p16<sup>INK4a</sup> augmentent modestement à l'approche de la sénescence puis atteignent leur maximum lorsque l'abondance de p21 diminue [238]. p21 serait alors responsable de l'arrêt de prolifération au stade précoce de la sénescence tandis que p16<sup>INK4a</sup> permettrait de maintenir l'arrêt caractéristique associé à la sénescence. Confirmant le rôle important de p21 lors de la sénescence, son inactivation chez les fibroblastes diploïdes normaux humains cause le contournement de la sénescence [239], bien que ce résultat soit contesté [240]. De plus, l'expression de p21 dans des cellules déficientes en p53 cause leur entrée en sénescence [241, 242]. La régulation de l'expression de p21 par p53 constitue donc un élément important dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Un régulateur important de l'axe p53/p21 est la protéine de remodelage de la chromatine p400, dont la déplétion cause une augmentation des niveaux de p21 et l'entrée prématurée en sénescence pouvant être contournée par l'ablation de p21 [243].

Toutefois, plusieurs données permettent de croire que p21 n'est pas l'unique gène régulé par p53 permettant l'entrée en sénescence. Tout d'abord, contrairement aux cellules

humaines, les MEFs provenant de souris  $p21^{-/-}$  entrent en sénescence selon une cinétique identique aux cellules de type sauvage. L'activation de l'oncogène Ras induit tout de même la sénescence chez les MEFs  $p21^{-/-}$ , mais pas chez les MEFs  $p53^{-/-}$  suggérant ainsi que le stress oncogénique déclenche plusieurs processus d'arrêt de croissance via p53 [244]. Confirmant cette hypothèse, l'expression d'un mutant de p53 permettant toujours l'induction de p21 bloque tout de même la sénescence des cellules humaines [245]. D'autres cibles de p53 pourraient donc contribuer à l'apparition du phénotype de sénescence.

#### 5.1.6.3 PAI-1

Considérée depuis longtemps comme un marqueur de la sénescence, la protéine PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) est une cible directe de p53 [229, 246]. PAI-1 inhibe l'activité de la protéase sécrétée uPA (*urokinase type plasminogen activator*) dont l'expression déclenche une cascade de signaux mitogéniques impliquant l'activation de PI(3)K et PKB/AKT et l'inhibition subséquente par phosphorylation en sérine 9 de GSK3 $\beta$ . GSK3 $\beta$  contrôle la dégradation et l'exclusion nucléaire de la cycline D1 via une phosphorylation inhibitrice en thréonine 286 [247]. La déplétion de PAI-1 permet l'échappement à la sénescence répllicative et cause une activation soutenue de la voie PI(3)K-PKB-GSK3 $\beta$  ainsi que la rétention nucléaire de la cycline D1. De plus, les cellules sénescents montrent des niveaux réduits de PKB activé, de phospho-GSK3 $\beta^{\text{Ser9}}$  ainsi qu'une réduction de cycline D1 nucléaire. Confirmant l'importance de cette voie lors de l'établissement de la sénescence, la surexpression de PAI-1, PTEN ou GSK3 $\beta$  cause la sénescence chez les cellules normales ou  $p53^{-/-}$  montrant que cette voie se situe en aval de p53. L'expression de p21 dans les cellules exprimant un shRNA contre PAI-1 déclenche l'entrée en sénescence ce qui indique que les voies des p21 et PAI-1 sont indépendantes bien qu'elles semblent converger vers l'inactivation des complexes cycline/CDK [115].



#### 5.1.6.4 PML

Le produit du gène *promyelocytic leukemia* (*PML*) agit en amont de p53 en stimulant son activité par son recrutement aux corps nucléaires PML (PML-NBs). Toutefois, PML est également une cible transcriptionnelle de p53 permettant de potentialiser ses effets anti-prolifératifs. Le promoteur de PML possède donc des sites de liaison à p53 permettant l'induction de PML en réponse aux oncogènes ainsi qu'au dommage à l'ADN. De plus, l'absence d'expression de PML diminue la capacité des cellules à déclencher les processus de sénescence ou d'apoptose en réponse à l'activation de p53 [248]. PML constitue donc un autre médiateur important des fonctions de suppression tumorale de p53. Une revue de la littérature est consacrée à PML plus loin dans cette thèse.

#### 5.2 *INK4b/ARF/INK4a* : Un locus suppresseur de tumeur

Le locus *INK4b/ARF/INK4a*, situé sur le chromosome 9 chez l'humain et sur le chromosome 4 chez la souris, représente un des sites les plus fréquents de délétion lors de cancers (revue dans [249]). Initialement, deux gènes furent identifiés pouvant représenter des suppresseurs tumoraux potentiels à l'intérieur d'une région de 40kb, soit *INK4a* et *INK4b* [250-253]. Ces gènes encodent pour les protéines p16<sup>INK4a</sup> et p15<sup>INK4b</sup> qui partagent un degré élevé de similitude au niveau des acides aminés. Au moment de leur localisation au chromosome 9, la classe d'inhibiteurs INK4 était déjà connue pour leur capacité à inhiber les kinases Cdk4 et Cdk6 [254]. La découverte subséquente des nombreuses mutations non-sens de p16<sup>INK4a</sup> chez des cas familiaux de mélanomes confirmait le rôle important de cette protéine dans les mécanismes de suppression tumorale [255, 256].

Toutefois, les protéines p16<sup>INK4a</sup> et p15<sup>INK4b</sup> ne constituent pas les seuls suppresseurs tumoraux localisés à ce locus situé au 9p21. La découverte d'un premier exon alternatif supplémentaire situé avant le premier exon de *INK4a* a révélé la présence de ARF (aussi nommé p14<sup>ARF</sup> chez l'humain et p19<sup>ARF</sup> chez la souris) [257]. Cette protéine possède

son propre promoteur et premier exon (exon 1 $\beta$ ), mais partage les deuxième et troisième exons avec p16<sup>INK4a</sup> (Figure 4). Tel que son nom l'indique (*Alternative Reading Frame*), ARF est traduit dans un cadre de lecture différent de celui utilisé par p16<sup>INK4a</sup> générant donc une protéine totalement différente ne partageant pas d'homologie avec p16<sup>INK4a</sup>.

La suppression de l'exon 1 $\beta$  de ARF chez la souris augmente l'apparition de tumeurs spontanées et induites [7, 257] comme il fut démontré par la délétion des exons 2 et 3 (souris p16<sup>INK4a-/-</sup> et p19<sup>ARF-/-</sup>) [258]. Le locus *INK4b/ARF/INK4a* code donc pour plusieurs protéines possédant une activité anti-tumorale.

### 5.2.1 Les activateurs du locus *INK4b/ARF/INK4a*

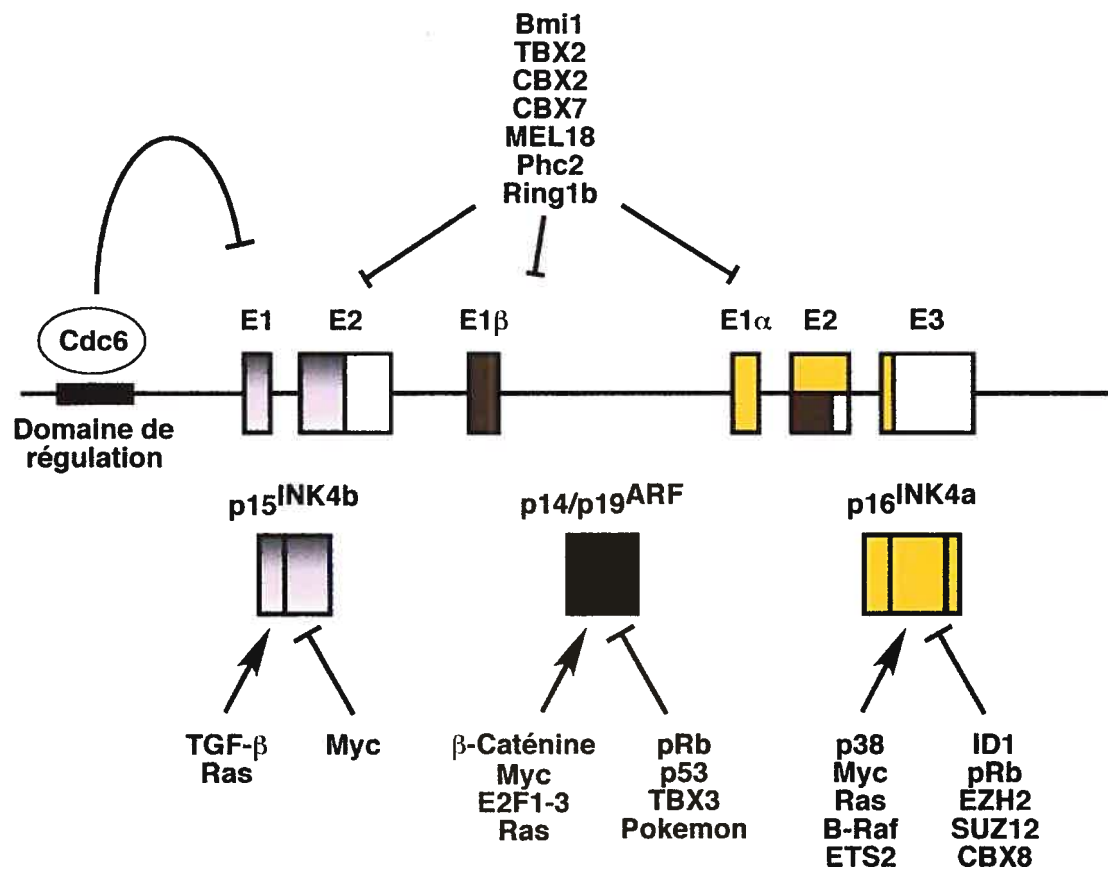
#### 5.2.1.1 Ras, Raf, p38

La voie de signalisation oncogénique de Ras cause l'activation transcriptionnelle de *INK4a* chez les fibroblastes primaires humains et murins afin d'induire la sénescence [96]. Les membres situés en aval de cette voie de signalisation, soit Raf et MEK, activent également *INK4a* proposant ainsi que l'activation de la cascade Ras/Raf/MEK mène à la phosphorylation et la stimulation d'un facteur de transcription pouvant réguler *INK4a* [99, 100, 259]. Le facteur de transcription Ets2 est activé par la voie de Ras et active le promoteur de *INK4a* [260]. Toutefois, l'accumulation de p16<sup>INK4a</sup> suivant l'activation de Ras s'effectue sur plusieurs jours et est donc beaucoup plus lente que la cinétique d'activation d'une cascade de phosphorylation.

La voie de signalisation déclenchée par l'expression de Ras augmente également les niveaux de p15<sup>INK4b</sup> [261, 262] et ARF [196, 263, 264] chez la souris. Le facteur de transcription DMP1 activé par Ras peut lier le promoteur de *ARF* et est responsable de l'induction de p19<sup>ARF</sup> suivant l'activation de Ras [265, 266].

**Figure 4. Régulateurs et organisation du locus INK4b/ARF/INK4a.** Les régions codantes sont indiquées en gris pour *p15<sup>INK4b</sup>*, noir pour *ARF* et orange pour *p16<sup>INK4a</sup>* tandis que les régions non transcrites sont en blanc. Les différents régulateurs du locus sont également indiqués. D'après [267]

Figure 4



### 5.2.1.2 Myc

Le facteur de transcription Myc lie la séquence consensus nommée boîte E sur l'ADN afin de réguler la transcription. Le promoteur et le premier intron de *INK4a* contiennent chacun une boîte E canonique pouvant être liée par Myc lorsque ce dernier est surexprimé [268] augmentant ainsi les niveaux d'expression de p16<sup>INK4a</sup> [11, 269]. Myc induit également l'expression de p19<sup>ARF</sup> [270]. La régulation des niveaux de p16<sup>INK4a</sup> et p19<sup>ARF</sup> par Myc est cependant complexe puisque Myc augmente également les niveaux du répresseur du locus Bmi-1 créant ainsi un circuit de régulation. La surexpression, en fonction des niveaux de WRN, comme la diminution des niveaux de Myc sont donc associées à l'entrée prématurée en sénescence causée par l'augmentation des niveaux de p16<sup>INK4a</sup> [268, 269].

Au niveau du gène *INK4b*, Myc possède une activité répressive et bloque l'association du facteur de transcription Miz-1 au promoteur. L'activation de ce promoteur induit par TGF- $\beta$  est attribuée à la diminution de Myc et au recrutement de différents facteurs au promoteur de *INK4b* [271-273].

### 5.2.1.3 E2F

La corrélation qui existe entre les niveaux de ARF et l'inactivation de Rb par des oncoprotéines virales suggère la présence d'un mécanisme de régulation de *ARF* par les membres de la famille E2F [274]. Il a été démontré par immunoprécipitation de la chromatine que différents membres des E2Fs sont liés au promoteur de *ARF* [275-277]. Puisqu'il existe un réseau complexe entre les différents E2Fs, l'activation directe (indépendante de la synthèse protéique *de novo*) de ARF n'a pu être démontré que pour E2F1 [278]. De plus, la surexpression de E2F1 cause l'accumulation de ARF [279, 280] et force l'entrée prématurée en sénescence d'une façon dépendante de p14<sup>ARF</sup> [111]. L'activation aberrante de la  $\beta$ -caténine permet également l'entrée en sénescence et l'augmentation des niveaux de ARF d'une manière partiellement dépendante de E2F [109]. Toutefois, l'activation transcriptionnelle de *ARF* par les E2Fs n'est pas classique, car les

niveaux de ARF ne varient pas lorsque les cellules réintègrent le cycle cellulaire, tel qu'habituellement observé pour les gènes ciblés par les E2Fs. De plus, les niveaux endogènes de E2F répriment habituellement  $p19^{ARF}$  [281]. En fait, E2F3 occupe normalement le promoteur de *ARF* afin de réprimer son expression [275]. L'induction de ARF par les E2Fs doit donc impliquer d'autres facteurs, un seuil critique d'activation ou même l'intégration d'autres signaux afin d'être pleinement efficace.

### 5.2.2 Les répresseurs du locus *INK4b/ARF/INK4a*

#### 5.2.2.1 p53

Un régulateur important du locus *INK4b/ARF/INK4a* est p53, ce qui crée une boucle de réponse négative afin de contrôler les niveaux d'activation de p53. Les cellules murines et humaines dont p53 est inactivé démontrent des quantités élevées de ARF. La réintroduction de p53 dans ces cellules entraîne la diminution de ARF selon un mécanisme encore mal défini [282].

#### 5.2.2.2 Id1

La capacité de certains facteurs à contrer des activateurs permet la répression du locus *INK4b/ARF/INK4a*. La protéine ID1 joue ce rôle en s'opposant à l'activité de Ets2 au niveau de *INK4a* [260]. De plus, la délétion du gène ID1 chez la souris cause une augmentation des niveaux de  $p16^{INK4a}$  et la sénescence [283].

#### 5.2.2.3 Pokemon/TBX2/TBX3

Le répresseur transcriptionnel Pokemon/ZBT7B cible le promoteur de *ARF* afin de contrôler ses niveaux d'expression. De plus, la perte de Pokemon chez les MEFs provoque une entrée en sénescence pouvant être renversée par la perte de *ARF* [284]. Outre les sites de liaison à Pokemon, le promoteur de *ARF* possède également des sites de liaison aux

protéines TBX (T-Box). Les protéines TBX2 et TBX3 régulent *ARF* à partir d'une variante de boîte T [285-287]. Bien que ces études portent principalement sur la régulation de *ARF* par ces protéines, TBX2 semble également apte à réprimer *INK4b* et *INK4a*. De plus, il est intéressant de noter que la capacité de TBX2 à restreindre l'expression de *INK4b/ARF/INK4a* fut identifiée lors d'un criblage d'une banque d'ADNc permettant d'échapper à la sénescence prématurée des MEFs *Bmi-1*<sup>-/-</sup> [287]. Comme TBX2, TBX3 empêche l'entrée en sénescence [286].

#### 5.2.2.4 Domaine de régulation et Cdc6

La proximité des trois gènes dans le locus *INK4b/ARF/INK4a* permet la régulation globale du locus par différents événements de remodelage de la chromatine. La découverte d'une origine de réplication de l'ADN adjacente à *INK4b* a révélé la présence d'un élément régulateur important du locus. Ce nouveau domaine de régulation est lié par Cdc6 ce qui permet le recrutement de HDAC1/2, la formation d'hétérochromatine (H3K9me3) et donc la répression des trois gènes du locus [288].

#### 5.2.2.5 Protéines Polycomb

La répression de *INK4b/ARF/INK4a* peut également survenir par le recrutement de répresseurs transcriptionnels membres du complexe Polycomb. Ce complexe génère et reconnaît les modifications des histones associées à la chromatine transcriptionnellement silencieuse. La protéine *Bmi-1*, un membre de la famille Polycomb initialement identifié comme un oncogène coopérant avec *Myc* [289, 290], régule le locus *INK4b/ARF/INK4a*. Les protéines du groupe Polycomb peuvent être séparées en deux classes. Tout d'abord, le complexe répressif Polycomb 2 (PRC2) comprenant les protéines EED, SUZ12 et EZH2 permet la méthylation en lysine 27 de l'histone H3. Par la suite, ces sites permettent le recrutement du complexe PRC1 grâce au chromodomaine des protéines CBX2, 4, 6, 7 et 8. En plus des protéines CBX, le complexe PRC1 est composé des protéines RING1a/b,

PHC1-3 et PCGF1-6 dont font partie Mel18 (PCGF2) et Bmi-1 (PCGF4). La délétion de Bmi-1 chez la souris cause l'apparition rapide des marqueurs de sénescence accompagnée par une augmentation remarquable des niveaux de  $p15^{INK4b}$ ,  $p19^{ARF}$  et  $p16^{INK4a}$  tandis que la suppression de *INK4a/ARF* rétablit le potentiel prolifératif des cellules Bmi-1<sup>-/-</sup> [291]. De plus, la surexpression de Bmi-1 accroît la longévité des cellules en culture selon un mécanisme impliquant l'inactivation de la voie de Rb [292].

La suppression génétique chez la souris de plusieurs membres de la famille Polycomb a renforcé notre compréhension de l'importance de cette famille dans la régulation du locus *INK4b/ARF/INK4a*. Par exemple, la délétion des gènes *CBX2/M33*, *Mel18*, *PHC2* et *RING1b* cause des défauts d'hématopoïèse ou de prolifération des MEFs attribuables du moins en partie à la dérégulation de *INK4a/ARF* [291, 293-295]. Toutefois, il fut reporté que Mel18 réprime Bmi-1 causant ainsi une augmentation des niveaux de  $p14^{ARF}$  et  $p16^{INK4a}$ , et donc l'entrée en sénescence [296]. Ces données apparemment contradictoires cachent probablement un réseau complexe de régulation et nécessitent d'être approfondies.

Plusieurs membres de la famille Polycomb semblent impliqués dans la régulation du locus *INK4b/ARF/INK4a* lors de la sénescence. Le criblage d'une banque d'ADNc afin de trouver de nouveaux gènes permettant de contourner la sénescence a permis d'identifier CBX7. La déplétion de CBX7 induit la sénescence prématurée via l'augmentation des niveaux de  $p16^{INK4a}$  et  $p14^{ARF}$  [297]. La protéine CBX8 bloque également l'entrée en sénescence en liant le locus *INK4a/ARF* [298]. Dans les cellules normales, les protéines Polycomb tapissent le locus *INK4b/ARF/INK4a*, mais sont dissociées chez les cellules sénescents [299]. Les niveaux de Bmi-1, CBX7 et de EZH2, la méthyltransférase permettant de modifier l'histone H3, diminuent chez ces cellules ce qui explique la dissociation observée des protéines Polycomb lors de la sénescence [292, 297, 299, 300]. Confirmant ce modèle, la déplétion de EZH2 ou de SUZ12 induit la sénescence prématurément [299]. Le mécanisme par lequel les cellules sénescents diminuent les niveaux de Bmi-1, CBX7 et EZH2 demeure toutefois inconnu, mais on sait que l'ablation



du co-activateur transcriptionnel Cited2 diminue Bmi-1 et Mel18 causant ainsi l'entrée en sénescence [301] tandis que p53 réprime le gène encodant EZH2 [302]. L'étude de facteurs contrôlant les niveaux protéiques des Polycomb, comme PASG dont la suppression cause la diminution de Bmi-1 et la sénescence [303], permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation du locus *INK4b/ARF/INK4a* lors de la sénescence.

### 5.3 Le suppresseur tumoral Rb

Le gène du rétinoblastome (Rb) fut découvert chez des jeunes enfants atteints de tumeurs de l'œil [304]. Le suppresseur tumoral Rb est le prototype d'une famille de protéines *pocket* incluant p107 et p130. Rb présente une forte homologie avec p107 et p130 particulièrement dans le domaine *pocket*. Ce grand domaine de Rb (acides aminés 395-876) permet son association avec E2F. Les protéines E2Fs sont des facteurs de transcription liant le site consensus TTTCGCGC sur l'ADN [305]. L'activité de E2F provient d'une famille de facteurs de transcription hétérodimériques où chaque dimère est formé d'un membre la famille E2F lié à un membre de la famille DP. Chez les mammifères, huit membres forment la famille E2F (E2F-1 à 8) tandis que seulement deux membres de la famille DP (DP-1 et 2) ont été caractérisés. Cette famille de facteurs active la transcription de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire dont cycline A, cycline E, E2F, Cdc2 et Cdc25A, ainsi que des enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN telles la dihydrofolate réductase, l'ADN polymérase  $\alpha$  et la thymidine kinase, et des protéines essentielles à la réplication de l'ADN comme Cdc6, PCNA, ORC1 et les protéines MCMs. Des gènes impliqués dans l'apoptose dont Apaf1, p73 et ARF sont également sous le contrôle de E2F (pour une revue [306]).

### 5.3.1 Les sous-groupes de la famille E2F

La famille E2F peut être subdivisée en différents sous-groupes selon leur activité. Tout d'abord, E2F1, 2 et 3 forment le groupe des E2Fs activateurs et sont requis pour l'activation de gènes impliqués dans la transition G1/S. La perte de ces trois E2Fs activateurs résulte en l'arrêt du cycle cellulaire [307]. De plus, la surexpression de E2F1, 2 ou 3 dans des fibroblastes quiescents immortalisés provoque l'entrée en phase S [308]. Toutefois, le locus *E2F3* encode pour les protéines E2F3a et E2F3b qui possèdent des fonctions différentes. E2F3a est un activateur transcriptionnel surtout exprimé en phase S tandis que E2F3b agit comme répresseur et ses niveaux ne semblent pas varier en fonction du cycle cellulaire. Rb permet la régulation de l'activité des E2Fs activateurs ainsi que celle de E2F4.

E2F4 et 5 quant à eux possèdent une activité répressive. Leur surexpression dans des fibroblastes quiescents ne permet pas l'entrée en phase S [308]. En fait, le rôle majeur de E2F4 et 5 s'avère être l'induction de la sortie du cycle cellulaire ainsi que la différenciation [309-311]. Les protéines p107 et p130 sont responsables de contrôler l'activité de E2F4 et 5. E2F6, 7 et 8 disposent également d'une activité répressive [312-314]. E2F6, 7 et 8 ne semblent toutefois pas être régulés par les membres de la famille Rb.

### 5.3.2 Contrôle de l'activité E2F

La régulation de l'activité E2F est dictée par les niveaux de phosphorylation de Rb. Sous sa forme hypophosphorylée, Rb lie et inhibe E2F, tandis que la phosphorylation de Rb permet le relâchement de E2F afin de permettre l'expression de gènes permettant l'entrée en phase S [315, 316]. La phosphorylation survient suite à l'action de signaux mitogéniques convergeant vers la machinerie du cycle cellulaire composée des complexes cycline D/CDK4 ou CDK6 en phase G1 précoce et cycline E/CDK2 en phase G1 tardive (revue dans [317]).

### 5.3.2.1 Régulation de l'activité cycline/CDK

L'activité des complexes cycline/CDK est régulée par les membres de la famille INK4 et Cip/Kip. Les protéines INK4, dont font partie p16<sup>INK4a</sup> [254], p15<sup>INK4b</sup> [252], p18<sup>INK4c</sup> [318, 319] et p19<sup>INK4d</sup> [319, 320], inhibent l'activité catalytique de CDK4 et CDK6. Le rayon d'activité de la famille Cip/Kip est cependant plus étendu et affecte l'activité des kinases dépendantes des cyclines A, E et D. La famille Cip/Kip inclut p21<sup>Cip1</sup> [233, 234], p27<sup>Kip1</sup> [321, 322] et p57<sup>Kip2</sup> [323, 324].

Bien que Rb, p107 et p130 ne régulent pas l'activité E2F de façon totalement identique, ces trois protéines démontrent une certaine redondance au niveau de la régulation du cycle cellulaire. Les fibroblastes n'exprimant pas Rb ou p107/p130 conservent la capacité d'arrêter la progression du cycle cellulaire en G0/G1, tandis que la perte des trois protéines *pocket* permet le contournement de la sénescence et rend les cellules immortelles [325, 326]. Bien que l'ablation du gène de Rb ou p107 n'a aucun effet sur l'établissement de la sénescence induite par Ras chez la souris, la perte combinée de Rb et p107 bloque l'entrée en sénescence induite par cet oncogène [327].

### 5.3.3 Rb et sénescence

De nombreuses oncoprotéines virales, dont E1A, antigène grand T et E7, possèdent un motif LXCXE permettant la liaison et l'inactivation de Rb. Or, ces protéines possèdent la capacité de contourner les sénescences répliquative et prématurée suggérant l'implication de Rb lors de ces phénomènes. La réintroduction de Rb dans des lignées cellulaires n'exprimant pas Rb est suffisante pour causer l'entrée en sénescence et ce même en absence de p53 [328]. De plus, Rb est maintenu dans son état hypophosphorylé lors de la sénescence [329]. L'hypophosphorylation de Rb chez les cellules sénescents est causée par la diminution de l'expression de nombreuses cyclines ainsi que de plusieurs CDKs dont les CDK2 et CDK4 [330-332]. Toutefois, la plus importante cause du maintien

de Rb sous sa forme hypophosphorylée lors de la sénescence est l'induction des niveaux de p21, p15<sup>INK4b</sup> et p16<sup>INK4a</sup> [238, 262].

Le maintien de Rb sous sa forme hypophosphorylée lors de la sénescence permet l'inhibition de l'activité E2F. Or, il a été démontré qu'une réduction globale de l'activité E2F par déplétion de DP1 induit la sénescence de fibroblastes normaux et de cellules cancéreuses en absence de p53 et Rb [333]. De plus, l'expression du facteur hDRIL1 stimule l'activité E2F et permet le contournement de la sénescence induite par Ras [334]. La régulation des E2Fs représente donc un élément important du processus de sénescence.

#### 5.3.4 Rb et formation de l'hétérochromatine associée à la sénescence

La sénescence cellulaire est caractérisée par un arrêt permanent de la croissance. Des domaines spécialisés d'hétérochromatine, nommés foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF), semblent contribuer à la sortie irréversible du cycle cellulaire en permettant la répression de gènes promouvant la prolifération. Selon des études récentes, chacun des foyers est le résultat de la condensation d'un chromosome unique [335, 336]. De plus, la présence de SAHF est observable lors de l'apparition du phénotype de sénescence *in vivo* [261].

Les SAHF contiennent de nombreux marqueurs d'hétérochromatine associés à la répression transcriptionnelle dont une structure compacte observable suite à la coloration de l'ADN, l'hypo-acétylation des histones, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, la protéine de l'hétérochromatine HP1 et la variante d'histone macroH2A [337, 338]. La formation de SAHF coïncide avec le recrutement de protéines de l'hétérochromatine, comme HP1, ainsi que de Rb aux promoteurs ciblés par E2F et est associée à la répression des gènes cibles de E2F dont cycline A, PCNA et Mcm3 [338]. De plus, la formation de SAHF dépend principalement de l'intégrité de la voie de Rb [338], bien que la voie de p53 semble également impliquée [339]. Plusieurs facteurs sont engagés dans la formation de SAHF. Tout d'abord, les protéines HMGA s'accumulent dans la chromatine des cellules

sénescentes et sont des constituants structuraux essentiels aux SAHF [340]. Les cellules sénescentes arborant la présence de SAHF possèdent des niveaux élevés de HMGA liés à la chromatine ainsi que la perte d'histone H1 [335]. Ces deux protéines compétitionnent pour un site commun de liaison, soit l'ADN inter-nucléosomique. Les protéines HIRA et ASF1a contribuent également à la formation de SAHF [337] tandis que la prohibitine permet le recrutement de HP1 $\gamma$  [341]. La prohibitine est une protéine pouvant interagir avec Rb et E2F [672] afin de recruter différents répresseurs dont HDAC1 et NCoR [673]. La prohibitine participe également au remodelage de la chromatine via le recrutement de Brg-1 et Brm [674], deux enzymes ATP-dépendantes modulant la répression des cibles de E2F1 [675].

### 5.3.5 Connexion des voies de Rb et de p53

Bien que p53 et Rb puissent induire des programmes de suppression tumorale indépendants, plusieurs éléments relient ces deux voies majeures. Tout d'abord, la capacité de Rb à bloquer l'activité E2F dépend de son état de phosphorylation et donc de l'activité des complexes cycline/CDK. Les inhibiteurs de ces complexes à activité kinase, dont fait partie p21, contribuent donc à l'activation de Rb [235]. Or, p21 constitue une cible transcriptionnelle classique de p53 [233]. L'activation de p53 permet donc de contrôler l'activité de Rb.

En plus de mener à la dégradation de p53 par ubiquitination, Mdm2 interagit avec Rb afin de stimuler sa dégradation d'une façon ne dépendant pas de l'ubiquitination [342, 343]. La protéine Mdm2 contrôle donc les voies de p53 et de Rb ce qui en fait un oncogène puissant.

La protéine Rb est également impliquée dans la régulation de l'activité de p53. Le promoteur du gène *ARF* est sous le contrôle de E2F-1 [280]. Une forte activité E2F conduit donc à l'augmentation des niveaux de p14 qui peut lier le complexe Mdm2-p53 afin de stabiliser p53. Ce lien entre les voies de p53 et de Rb permet d'activer p53 en cas de perte d'expression de Rb.

### 5.3.6 Importance relative des axes $p16^{INK4a}$ -Rb et $p14^{ARF}/p19^{ARF}$ -p53 dans la suppression tumorale chez l'humain et la souris

La comparaison des mécanismes de suppression tumorale déclenchés chez l'humain et la souris a permis de déceler des différences dans la contribution de  $p16^{INK4a}$  et  $p14^{ARF}/p19^{ARF}$  chez ces deux espèces. En fait, la protéine  $p16^{INK4a}$  semble être plus importante lors de la suppression tumorale et la sénescence chez l'humain, tandis que  $p19^{ARF}$  joue un rôle prééminent chez la souris.

Chez la souris, de nombreuses données suggèrent que  $p19^{ARF}$  joue le rôle prépondérant de suppresseur tumoral. La caractérisation des souris chez lesquelles différents exons du locus *INK4b/ARF/INK4a* furent supprimés montre que les trois gènes confèrent, selon différentes efficacités, une protection contre la formation de tumeurs [7, 344-346]. Bien que  $p19^{ARF}$  semble posséder la plus forte activité de suppression tumorale, la comparaison de la susceptibilité à former des tumeurs est exacerbée chez les souris double mutantes  $p16^{INK4a-/-}/p19^{ARF-/-}$  comparativement aux souris  $p19^{ARF-/-}$  [347]. De plus, l'étude des capacités prolifératives des cellules dérivées des différentes souris mutantes au niveau du locus montre que les cellules  $p19^{ARF-/-}$  sont immortelles et non les cellules  $p16^{INK4a-/-}$  ou  $p15^{INK4b}$  [7, 344-346].

Bien que l'expression de  $p16^{INK4a}$  [100, 348] ou  $p14^{ARF}$  [111] soit suffisante pour causer la sénescence dans les cellules humaines, la protéine  $p16^{INK4a}$  paraît plus importante. Chez l'humain, malgré le fait que le locus *INK4b/ARF/INK4a* est fréquemment complètement supprimé dans de nombreux cancers, la grande majorité des mutations ponctuelles et altérations intragéniques ciblent *INK4a* plutôt que *INK4b* et *ARF*. De plus, les cellules n'exprimant pas  $p16^{INK4a}$  sont résistantes à la sénescence induite par Ras [349]. Finalement, l'expression de Ras dans les cellules humaines n'induit pas d'augmentation notable des niveaux de  $p14^{ARF}$  [90, 349, 350], contrairement à ce qui est observé chez les cellules de souris.

De plus, l'inactivation de la voie de p53 ou de Rb est suffisante au contournement de la sénescence induite par Ras chez les cellules de souris tandis que la majorité des

fibroblastes humains requièrent l'inhibition des deux voies afin de ne pas entrer en sénescence [9]. Ces données suggèrent que les voies de p53 et Rb sont organisées de façon linéaire chez la souris mais constituent deux voies parallèles chez l'humain. Tous les types de fibroblastes humains ne se comportent toutefois pas de la même façon en réponse à l'oncogène Ras. Par exemple, chez différentes souches de fibroblastes de prépuce humain, la sénescence induite par Ras peut dépendre de p53 ou Rb [9], nécessiter uniquement p53 [351] ou même ne pas avoir lieu [352].

La stabilité du phénotype de sénescence présente également des différences chez les espèces humaines et murines. L'inactivation de p53 ou Rb chez les MEFs sénescents cause le renversement du phénotype de sénescence et l'entrée du cycle cellulaire [353, 354], ce qui suggère que ces voies sont non seulement impliquées dans l'entrée en sénescence, mais sont également responsables du maintien du phénotype. Cependant, chez l'humain, lorsque la voie de Rb est pleinement engagée, particulièrement via p16<sup>INK4a</sup>, la sénescence devient irréversible et ne peut être renversée par l'inactivation subséquente de p53 ou Rb [355, 356]. Toutefois, cette inactivation subséquente de p53 ou Rb chez les cellules sénescents humaines permet la synthèse de l'ADN sans pourtant proliférer, suggérant la présence d'une seconde barrière en G2/M [355]. Or, la voie de p16<sup>INK4a</sup>-Rb contribue au maintien du programme de sénescence afin de le rendre irréversible en induisant une boucle de rétro-activation positive entre la génération de ROS et l'activation de PKCδ. Cette boucle activatrice est maintenue suite à l'inactivation subséquente de Rb et mène à la réduction des niveaux de WARTS/LATS1, une kinase requise pour la cytokinèse, créant ainsi une seconde barrière contre la transformation [357].

Ces données montrent la prédominance de l'axe ARF-p53 chez la souris tandis que les cellules humaines semblent privilégier l'axe INK4a-Rb tout en activant p53 lors de la sénescence.

## 5.4 La protéine PML

### 5.4.1 Leucémie promyélocytique aiguë et PML

Le gène *PML* (*promyelocytic leukemia*) fut initialement identifié comme partenaire de fusion du gène du récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) lors de la translocation chromosomique t(15;17) présente chez les patients atteints de leucémie promyélocytique aiguë (APL) [358-363]. La protéine de fusion résultante PML-RAR $\alpha$  est suffisante à l'induction de leucémies lorsque surexprimée chez des souris transgéniques [364]. Le locus *PML* s'étend sur plus de 35 kb et contient neuf exons. Plus d'une quinzaine de transcrits de *PML* sont générés par épissage alternatif [365]. Tous les isoformes de PML possèdent la même portion N-terminale mais diffèrent dans leur portion C-terminale (Figure 5A). Le domaine N-terminal commun à tous les isoformes contient un motif RBCC. Ce domaine est composé d'un motif doigt de zinc RING suivi de deux doigts de zinc B1 et B2 qui précèdent un motif en hélice de type *coiled-coil*. Presque tous les isoformes de PML forment des sous-domaines à l'intérieur du noyau nommés corps nucléaires PML (PML-NBs) [366]. De façon surprenante, seul l'isoforme PML-VII possède une distribution cytoplasmique [365, 367, 368]. L'isoforme PML-I possède quant à lui une localisation cytoplasmique et nucléaire due à la présence d'un signal d'exclusion nucléaire [369].

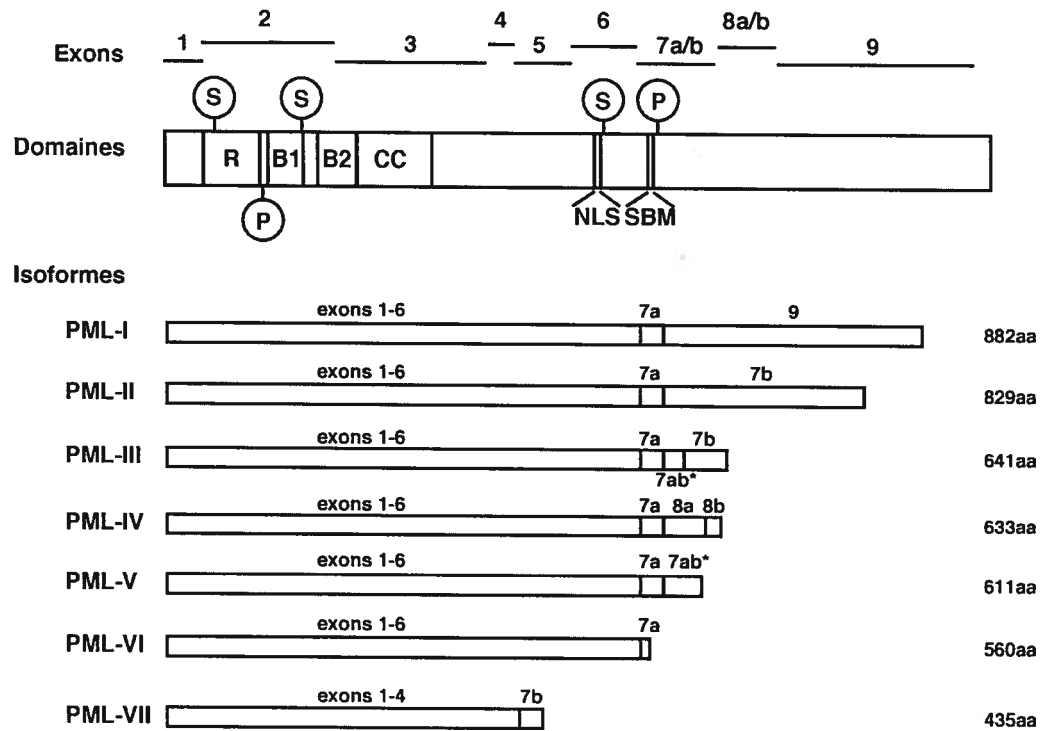
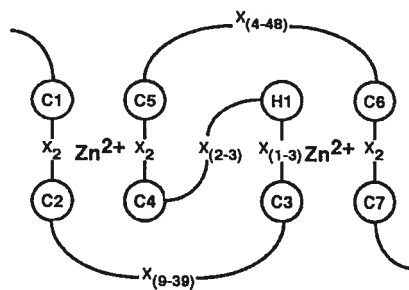
### 5.4.2 Le domaine RING : Structure et fonction

PML est un des membres fondateurs de la famille de protéines possédant un domaine RING (*really interesting new gene*). Ce domaine se distingue par la présence d'un motif doigt de zinc de type C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> ou plus précisément par la séquence consensus CX<sub>2</sub>CX<sub>(9-39)</sub>CX<sub>(1-3)</sub>HX<sub>(2-3)</sub>C/HX<sub>2</sub>CX<sub>(4-48)</sub>CX<sub>2</sub>C (Figure 5B). Récemment, de nombreux laboratoires étudiant différents processus cellulaires ont émis l'hypothèse que les protéines à domaine RING pourraient permettre le transfert de groupements ubiquitines à différents



**Figure 5. Représentation schématique des différents isoformes de PML montrant l'assemblage des exons.** A) Les domaines RBCC contenant le motif RING (R), les deux doigts de zinc (B1 et B2) ainsi que le motif *coiled-coil* (CC) sont présents dans tous les isoformes. Les sites de sumoylation (K65, K160 et K490) ainsi que les sites de phosphorylation par Chk2 (S117) et CK2 (S517) sont indiqués. Le signal de localisation nucléaire (NLS) et le domaine de liaison à SUMO (SBM) sont également montrés. L'intron 7ab\* est conservé chez quelques isoformes. De plus, plusieurs isoformes peuvent exister sans l'exon 5 et/ou sans les exons 5 et 6 et/ou sans les exons 4, 5 et 6. La classification des isoformes correspond à celle proposée par Jensen *et al.* (2001) [368]. B) Schéma du motif RING d'après [370].

Figure 5

**A****B**

substrats protéiques. La liaison entre l'activité ubiquitine ligase et le domaine RING a été démontrée pour de nombreuses protéines dont COP1 [182], PirH2 [183], Mdm2 [174], Rbx1 [371, 372] et Cbl [373-375]. De plus, certaines SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) ligases de type E3, telle PIAS, possèdent également un domaine RING et requièrent ce domaine afin de permettre le transfert de groupements SUMO [376]. Toutefois, une telle activité ubiquitine ligase ou SUMO ligase n'a pas encore été observée dans le cas de PML. Le domaine RING de PML participe toutefois à la liaison de nombreux facteurs cellulaires tels eIF4E [377] et Ubc9 [378]. Le domaine RING est également requis pour la sumoylation de PML ainsi que pour la formation des corps nucléaires PML [378-382].

#### 5.4.3 PML forme des structures sub-nucléaires

Le noyau, tout comme le reste de la cellule, est formé de compartiments et structures hautement organisés. Plusieurs structures sub-nucléaires ont d'ailleurs été associées à différentes fonctions biochimiques.

PML forme des sous-domaines nucléaires nommés corps nucléaires PML (PML-NBs), domaines oncogéniques PML (POD), corps Kremer (Kr) ou domaines nucléaires 10 (ND10) [366, 383, 384]. Ces domaines en forme de beigne constituent des structures d'environ 0,2 à 1 µm de diamètre et on peut en compter entre 10 et 30 par cellule, bien que leur nombre et leur taille varient en fonction du cycle cellulaire [385, 386]. PML est requis à la formation des PML-NBs, car ces structures sont absentes des cellules de souris PML<sup>-/-</sup> et sont reformées suite à la réintroduction de PML. Il est également clair que la sumoylation de PML constitue un événement crucial à la formation des PML-NBs puisque l'expression d'un mutant non sumoylable de PML est insuffisante à la reconstitution de ces structures [381, 382, 387]. Confirmant le rôle critique de la sumoylation dans la formation des PML-NBs, les cellules n'exprimant pas l'enzyme de conjugaison de type E2 de groupements SUMO, Ubc9, n'arborent pas de PML-NBs [388]. La sumoylation constitue donc un processus primordial à la formation des PML-NBs. De plus, PML possède trois sites de sumoylation situés dans les domaines RING (K65), B1 (K160) et *coiled-coil* (K490) [389]. Bien que la sumoylation *in vivo* de la lysine 65 est controversée, les lysines 160 et 490

représentent les sites majeurs de modification par SUMO. La découverte récente d'un motif consensus de liaison à SUMO dans la partie C-terminale de PML a permis de proposer un modèle expliquant la formation des PML-NBs [380]. Selon ce modèle, PML joue un rôle structural dans la formation des PML-NBs par sa capacité à former des dimères ainsi que par la formation de liaisons non covalentes entre le domaine de liaison à SUMO et les formes sumoylées de PML. Par la suite, les domaines de liaison à SUMO de PML peuvent recruter d'autres protéines sumoylées telles que Daxx et p53. De plus, les nombreux sites de sumoylation de PML constituent des sites d'ancrage pour les protéines contenant des motifs de liaison à SUMO. La modification par SUMO est donc l'élément clef permettant la création des structures complexes que sont les PML-NBs.

#### **5.4.3.1 Les corps nucléaires PML : entrepôts nucléaires?**

À ce jour, plus d'une cinquantaine de protéines logent dans les PML-NBs et la fonction de plusieurs de ces protéines semble être régulée par PML (Tableau II). Le grand nombre de protéines localisant aux PML-NBs suggère que ces structures représentent de larges entrepôts nucléaires pour des protéines régulatrices [390]. À partir de ce modèle général, plusieurs variations peuvent être avancées. Tout d'abord, les PML-NBs pourraient 1) séquestrer des facteurs hors du nucléoplasme afin de moduler leur concentration active. Par exemple, la forme phosphorylée de Akt localise aux PML-NBs limitant ainsi son activité nucléaire [391]. Les PML-NBs 2) constitueraient des sites de modification permettant de contrôler l'activité des facteurs cellulaires. La présence de la phosphatase PP2a, qui a pour substrat Akt et inhibe son activité, en est un bon exemple [391]. L'activation de p53 via l'acétylation par CBP et la phosphorylation par Chk2 et HIPK2 appuient également ce modèle [165, 392, 393]. 3) Les PML-NBs favoriseraient la formation de larges complexes fonctionnels en réunissant différents facteurs comme c'est le cas lors de la répression transcriptionnelle causée par Mad où PML forme un complexe de répresseurs [394].

**Tableau II. Protéines interagissant avec PML ou transitant dans les corps nucléaires PML (PML-NBs).**

<b>Protéine</b>	<b>Activité/Fonction biologique</b>	<b>Références</b>
Sp100	Régulation transcriptionnelle	[395]
SUMO	Structure	[396-398]
Ubc9	E2 SUMO ligase/localisation, structure	[378]
CBP	Acétyltransférase/activation de p53	[399-401]
p53	Facteur de transcription/suppression tumorale	[90, 165, 402-404]
p73	Facteur de transcription	[405, 406]
Daxx	Apoptose	[382, 407-409]
HAUSP	Dé-ubiquitination	[410]
Mdm2	Ubiquitination/dégradation de p53	[411-413]
L11	Recrutement de PML au nucléole après dommage à l'ADN	[414]
HIPK2	Kinase/phosphorylation de p53	[415, 416]
Rb	Répression de la transcription par E2F	[90, 417, 418]
c-Ski	Répression transcriptionnelle	[394]
N-CoR	Répression transcriptionnelle	[394]
mSin3A	Répression transcriptionnelle	[394]
HDAC1	Répression transcriptionnelle	[394]
HIRA	Formation de l'hétérochromatine	[337]
HP1 $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$	Formation de l'hétérochromatine	[337, 419]
Suv39H1	Histone méthyltransférase /formation de l'hétérochromatine	[420]
Myc	Facteur de transcription	[421, 422]
eIF4e	Traduction	[377, 423, 424]
$\gamma$ H2AX	Histone/réponse de dommage à l'ADN	[425]
Mre11	Réponse de dommage à l'ADN	[425, 426]
NBS1	Réponse de dommage à l'ADN	[426]
Chk2	Réponse de dommage à l'ADN	[393, 427]
Brcal	Réponse de dommage à l'ADN et réparation	[428]
TRF1/2	Protection des télomères	[429]
BLM	Réparation par recombinaison homologue	[382]

TopBP1	Réplication et réparation de l'ADN	[430]
PRMT1	Arginine méthyltransférase/localisation de Mre11	[431]
PP2a	Protéine phosphatase	[391]
pAkt	Kinase/transducteur du signal	[391]
mTOR	Kinase/régulation de la synthèse protéique	[432]
LEF1	Facteur de transcription	[433]
PIASy	E3 SUMO ligase	[433]

PML et les PML-NBs sont impliqués dans de nombreux processus dont la prolifération cellulaire, l'apoptose, la stabilité génomique et la sénescence. Il est remarquable que les différentes activités biochimiques de PML convergent dans la promotion de différents programmes de protection anti-tumorale [434].

#### 5.4.4 Régulation de l'expression de PML

L'expression de PML est modulée en fonction de différents stress comme les infections virales [435], les chocs thermiques [436], l'irradiation par des rayonnements ionisants [437] et lors du cycle cellulaire où PML semble s'accumuler durant la phase G1 [386].

L'analyse approfondie du promoteur de *PML* a permis de mettre en évidence la présence d'éléments de réponse aux interférons (*interferon stimulated response element; ISRE*) ainsi que des sites de gamma activation (*gamma activation site; GAS*) [438]. Ces éléments de réponse constituent des sites de liaison pour les STATs (*signal transducers and activators of transcription*) et permettent l'induction de PML suite à la stimulation par certaines cytokines dont les interférons [438-441]. Le promoteur de *PML* répond également à p53 [248, 437]. Trois éléments de réponse parsèment le promoteur de *PML* chez la souris tandis qu'un seul élément est présent sur le promoteur humain [248]. *PML* est donc une cible transcriptionnelle directe de p53 et peut ainsi contribuer à la suppression tumorale provoquée par p53.

#### 5.4.5 PML, cancer et suppression tumorale

##### 5.4.5.1 Modèle de l'origine de APL

L'étude de la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$ , caractéristique de la leucémie promyélocytique aiguë (APL), a fourni de nombreux indices quant au rôle de PML dans la suppression tumorale. Dans la plupart des cas de APL, le gène *PML* sur le chromosome 15

fusionne avec le gène du récepteur de l'acide rétinoïque (*RARα*) sur le chromosome 17. La translocation réciproque ainsi générée produit deux gènes de fusion encodant pour les protéines PML-*RARα* et *RARα*-PML [442]. Jusqu'à maintenant, la plupart des efforts de recherche furent concentrés sur PML et PML-*RARα* tandis que la fonction de *RARα*-PML demeure abstraite.

La fusion PML-*RARα* conserve les domaines de liaison à l'ADN et au ligand de *RARα*, mais inhibe sa fonction transcriptionnelle par le recrutement aberrant de co-répresseurs et d'histone déacétylases [443-445]. Il fut donc suggéré que PML-*RARα* agissait comme mutant dominant négatif de *RARα* bloquant la différenciation des cellules promyélocytiques et causant ainsi la maladie APL. Ce modèle est appuyé par le fait que les patients APL obtiennent une rémission complète suite au traitement à l'acide rétinoïque. En effet, le traitement à l'acide rétinoïque permettrait de rétablir l'expression des gènes essentiels à la différenciation qui sont réprimés par PML-*RARα*. Toutefois, ce modèle n'explique pas le fait que la différenciation des granulocytes ne nécessite par *RAR in vivo* et que les souris *RAR<sup>-/-</sup>* ne développent pas la maladie APL révélant ainsi l'importance de l'inactivation de PML dans la pathogenèse [446, 447]. Des études plus approfondies de l'effet de l'acide rétinoïque lors de APL ont démontré que ce traitement induit la dégradation de PML-*RARα* [448, 449] permettant la relâche de PML ainsi que le rétablissement des PML-NBs [366, 383, 450]. De plus, l'inactivation de PML *in vivo* augmente de manière significative l'incidence des leucémies induites chez les souris transgéniques PML-*RARα* [451]. Ces résultats ont donc mis à jour le rôle clair que joue PML comme suppresseur tumoral et suggèrent que cette fonction cruciale est altérée lors de APL.

#### 5.4.5.2 Perte de l'expression de PML dans les cancers

Outre son implication dans la maladie APL, la protéine PML est dérégulée dans de nombreux cancers humains dont ceux de la prostate, du colon, du sein et du poumon [385, 452, 453]. Suggérant un rôle important de PML dans la tumorigenèse humaine, la perte de



l'expression de PML est associée à l'acquisition du caractère invasif lors de la progression tumorale [385, 453]. Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques du protéasome, il fut déterminé que la perte de l'expression de PML survient de façon post-traductionnelle par un mécanisme dépendant du protéasome. La cause de cette perte d'expression demeurerait un mystère, mais une kinase possédant une activité oncogénique semble être responsable de la dégradation de PML d'une façon dépendante de l'ubiquitine. La caséine kinase 2 (CK2) phosphoryle PML *in vitro* et *in vivo* à la position S517 [454] et cette modification entraînerait par la suite la poly-ubiquitination de PML ainsi que sa dégradation par le protéasome. La corrélation entre l'absence d'expression de PML et la tumorigenèse indique que PML jouerait le rôle de suppresseur tumoral et inhiberait la croissance cellulaire.

#### 5.4.5.3 PML, prolifération des cellules tumorales et angiogenèse

La surexpression de PML bloque de façon efficace la croissance de nombreuses lignées cellulaires *in vitro* [455-460]. Toutefois, l'argument le plus convaincant plaident pour le rôle de suppresseur tumoral de PML provient de l'étude de souris chez lesquelles le gène *PML* fut inactivé. Les souris *PML*<sup>-/-</sup> développent spontanément des tumeurs au niveau de la prostate [391]. De plus, les souris *PML*<sup>-/-</sup> montrent une susceptibilité élevée au développement de tumeurs induites chimiquement selon un protocole de carcinogenèse en deux étapes (traitement avec l'initiateur de tumeur diméthylbenzanthracène [DMBA] suivi par un traitement avec le promoteur tumoral 12-0-tétra-décanoylphorbol-13-acétate [TPA] [461]) [462]. Suite à l'injection de DMBA dans la glande salivaire, les souris *PML*<sup>-/-</sup> sont plus susceptibles à la formation de tumeurs que les souris de type sauvage [462].

L'inactivation de PML dans un modèle murin de susceptibilité tumorale comme les souris *PTEN*<sup>+/-</sup> favorise l'incidence et la progression de tumeurs du colon et de la prostate. La tumorigenèse chez les souris *PTEN*<sup>+/-</sup> est causée par une suractivation de Akt par phosphorylation et par l'inactivation de facteurs de transcription nucléaires par Akt. Or, PML recrute la phosphatase ciblant Akt, PP2a, ainsi que la forme phosphorylée de Akt dans les PML-NBs permettant de contrôler l'activité oncogénique de Akt [391].

La progression tumorale et l'acquisition du caractère invasif d'un cancer dépendent de la capacité de la tumeur à promouvoir la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. La néo-angiogenèse constitue une réponse à l'hypoxie intra-tumorale menant à l'augmentation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  et de sa cible VEGF [463]. En conditions hypoxiques, PML agit comme régulateur négatif de la synthèse de HIF-1 $\alpha$  en réprimant mTOR. De plus, les tumeurs provenant de souris PML<sup>-/-</sup> démontrent une angiogenèse accrue favorisant la prolifération des tumeurs [432].

Réunies, ces données indiquent que PML agit *in vivo* comme suppresseur tumoral lors de la tumorigénèse et n'est pas exclusif à APL.

#### 5.4.6 PML et sénescence

Lors de la sénescence répllicative, le nombre et la taille des PML-NBs augmentent dans les cellules humaines tandis que cette induction est renversée lorsque la sénescence est contournée par l'expression de l'antigène T de SV40 [464]. Toutefois, le rôle que joue PML lors de la sénescence répllicative reste encore peu et mal compris. Son implication lors de la sénescence prématurée induites par les oncogènes est cependant crucial. Tout d'abord, l'expression de l'oncogène Ras cause une forte accumulation de PML résultant en une augmentation en taille et en nombre des PML-NBs, comme il fut initialement observé lors de la sénescence répllicative [90, 165]. Deux observations ont permis de lever le voile sur le rôle clef de PML comme régulateur de la sénescence. Premièrement, la sénescence induite par Ras est réduite de façon drastique chez les fibroblastes de souris PML<sup>-/-</sup> suggérant que PML est nécessaire à l'induction de la sénescence par Ras [165]. En second lieu, la surexpression de PML est suffisante à l'induction du phénotype de sénescence dans les cellules murines et humaines [90, 165]. Toutefois, selon une étude comparative de la capacité des isoformes PML-I à PML-V à induire la sénescence, seule l'expression de l'isoforme PML-IV cause l'apparition des marqueurs de sénescence [465]. Étonnamment, la mutation des trois sites de sumoylation n'altère pas la capacité de PML-IV à induire la

sénescence. Chez la souris, la capacité de PML à induire la sénescence dépend de p53, suggérant ainsi que PML régule l'activité de p53.

#### 5.4.6.1 PML et activation des suppresseurs tumoraux

Un réseau important d'interactions protéiques semble relier les suppresseurs de tumeurs PML et p53. En plus de colocaliser dans les PML-NBs, p53 interagit directement avec PML *in vitro* et *in vivo* [90, 165, 403, 404]. L'interaction entre PML et p53 requiert la région C-terminale de PML et le domaine de liaison à l'ADN de p53. Cette liaison directe pourrait permettre le recrutement de p53 aux PML-NBs afin de promouvoir l'activation de p53 en favorisant la formation de complexes d'activation. Il a déjà été démontré que CBP, une acétyltransférase modifiant p53 en lysine 382, transite par les PML-NBs [399-401]. Or, l'expression de Ras induit l'acétylation de p53 en lysine 382 ainsi que la formation de complexes entre PML, p53 et CBP suggérant que p53 puisse interagir avec des activateurs dans les PML-NBs [165]. L'acétylation de p53 en lysine 382 est renversée par la déacétylase SIRT1 qui est impliquée dans la régulation de la longévité chez le ver et la levure. Confirmant l'importance du processus de l'acétylation de p53 dans la sénescence induite par PML, la surexpression de SIRT1 bloque l'entrée en sénescence [466].

Toutefois, PML peut agir comme co-activateur transcriptionnel de p53 même suite à la substitution des lysines présentes aux sites d'acétylation (p53<sup>K382R</sup>, p53<sup>K320R</sup> et p53<sup>5KR</sup>) suggérant la capacité de PML d'amplifier l'activité de p53 par d'autres mécanismes que l'acétylation. La capacité qu'a PML de lier Mdm2 nous indique que PML pourrait directement influencer la stabilité de la protéine p53 [411-413]. L'expression croissante de PML augmente directement la demi-vie de la protéine p53 et ce en séquestrant Mdm2 au nucléole [414]. Il est également possible d'extrapoler le rôle de PML dans la régulation de la stabilité de Mdm2 causée par Daxx et la dé-ubiquitinase HAUSP, deux autres résidents des PML-NBs [382, 407-410, 467]. La protéine Daxx est impliquée dans la stabilisation de Mdm2 par sa capacité à recruter la dé-ubiquitinase HAUSP [468]. Or, cette dé-ubiquitinase catalyse l'enlèvement des groupements ubiquitines présents sur Mdm2 résultant en la stabilisation de la protéine [469, 470]. Toutefois, d'autres études démontrent que HAUSP

dé-ubiquitine et stabilise p53 [471-473]. Ces résultats indiquent la dualité de spécificité de HAUSP envers p53 et Mdm2 et proposent que ce serait plutôt la dé-ubiquitination nette des différentes cibles de HAUSP qui détermine les niveaux de p53. L'implication de PML dans ce réseau d'interactions nécessite d'être approfondie.

L'activation de p53 survient également suite à sa modification par phosphorylation. La kinase HIPK2 est recrutée avec p53 aux PML-NBs menant à l'activation transcriptionnelle de p53 suite à sa phosphorylation en sérine 46 [415, 416]. La protéine p53 est également activée suite à sa phosphorylation en sérine 20 par Chk2 [474], une kinase qui réside également aux PML-NBs [393, 427]. Cependant, les données concernant l'activation de p53 par Chk2 demeurent aujourd'hui contestées [475].

Ces résultats indiquent l'existence d'un réseau complexe entre les voies de suppression tumorale de PML et p53, et démontrent le rôle important des PML-NBs ainsi que des protéines y résidant dans la modulation de l'activité de p53.

#### **5.4.6.2 PML, Rb et répression transcriptionnelle**

Outre p53, Rb représente un régulateur crucial du cycle cellulaire et de la sénescence. La forme hypophosphorylée de Rb se retrouve aux PML-NBs et PML augmente la répression transcriptionnelle provoquée par Rb en recrutant l'activité histone déacétylase de HDAC1 [418, 476, 477]. Le rôle de répresseur transcriptionnel exercé par PML fut également observé dans le cas du suppresseur tumoral Mad où PML forme des complexes de corépresseurs avec c-Ski, N-CoR et mSin3A [394]. Il est intéressant de noter que Rb peut s'associer à ces différents co-répresseurs [478]. Toutefois, le rôle joué par Rb dans la suppression tumorale induite par PML demeure nébuleux. Le premier chapitre de la présente thèse tentera d'éclaircir le rôle de Rb dans le cadre de la sénescence prématurée induite par PML.

#### 5.4.6.3 PML et SAHF

La protéine Rb est également impliquée dans la formation de foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF), soit de la répression stable de la transcription. Cette activité requiert le recrutement d'histone méthyltransférases (Suv39H1) et d'histone déacétylases (HDAC) ainsi que d'autres facteurs tels HP1 et HIRA. Plusieurs de ces facteurs, soit HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  et HIRA, transitent dans les PML-NBs avant de former les SAHF [337]. De plus, Suv39H1 et HDAC localisent aussi aux PML-NBs où ils pourraient être recrutés par d'autres facteurs afin de former l'hétérochromatine [420].

#### 5.4.7 PML, stabilité génomique et réponse de dommage à l'ADN

De nombreuses protéines impliquées dans la reconnaissance ou la réparation de dommages de l'ADN transitent par ou sont présentes dans les PML-NBs de façon ubiquiste ou stimulée suite au bris de l'ADN (Tableau II). Par exemple, les protéines ATR et RPA se retrouvent normalement dans les PML-NBs, mais sont relâchées suite à l'endommagement de l'ADN [479].

De plus, l'inactivation de PML pourrait contribuer à la progression tumorale en favorisant l'apparition et l'accumulation de lésions génétiques. En fait, de nombreuses protéines impliquées dans la stabilité génomique localisent aux PML-NBs, telles NBS, BLM et Mre11 (Tableau II). La fonction de ces protéines pourrait être régulée par PML via leur localisation dans les PML-NBs. Supportant cette hypothèse, la protéine BLM est délocalisée dans les cellules PML<sup>-/-</sup> et les cellules de patients APL [480]. Or, la fréquence de l'échange de chromatides sœurs, signe moléculaire distinctif d'instabilité génomique présent chez les cellules de patients atteints du syndrome de Bloom, est largement augmentée dans les cellules PML<sup>-/-</sup> suggérant que la localisation de BLM dans les PML-NBs est requise pour sa pleine fonctionnalité [480].

## **5.5 Sénescence et réponse de dommage à l'ADN**

De nombreuses études génétiques menées sur les facteurs impliqués lors de la réparation de l'ADN supportent le rôle important de cette voie dans la prévention de la sénescence cellulaire et du vieillissement prématuré. Le dommage subi par l'ADN peut déclencher de nombreuses réponses cellulaires incluant la réparation de l'ADN endommagé, l'activation de points de contrôle ou la mort cellulaire [481]. La réparation de l'ADN peut s'effectuer selon différents mécanismes impliquant plusieurs complexes protéiques et selon la nature du dommage. Les bases endommagées suite à l'exposition aux rayons UV ou à différents produits chimiques engagent la voie de réparation par excision nucléotidique (NER) tandis que les bris double brin de l'ADN sont réparés par recombinaison homologe (HR) ou par la liaison non homologue des extrémités (NHEJ) (revue dans [482]). Contrairement à la spécificité des mécanismes de réparation, une voie commune est responsable de la détection des lésions et l'activation des effecteurs exécutant la réparation de l'ADN, le déclenchement de points de contrôle ou de la mort cellulaire.

### **5.5.1 La voie de signalisation du dommage à l'ADN**

La réponse cellulaire aux dommages à l'ADN implique une voie de signalisation permettant l'arrêt du cycle cellulaire afin d'empêcher la réplication de l'ADN endommagé. La voie de signalisation du dommage à l'ADN est constituée de quatre classes de composants : les initiateurs de la réponse du dommage, les médiateurs, les transducteurs du signal et les effecteurs (Figure 6).

#### **5.5.1.1 Les initiateurs de la réponse au dommage à l'ADN**

La cascade d'événements déclenchée suite au dommage de l'ADN est initiée par l'activation d'une famille de kinases similaires à la phosphoinositide 3-kinase (PIKK) comprenant les protéines ATM, ATR et DNA-PK. La mutation de ATM cause l'ataxie

télangiectasie chez l'humain, condition caractérisée par une immunodéficience, une dégénérescence neuronale, une prédisposition au cancer et une instabilité génomique [483]. L'identification du gène *ATM* a révélé un énorme gène codant pour une protéine d'environ 350 kDa possédant une activité kinase stimulée par des agents causant des bris double brin dans l'ADN [484, 485]. Grâce à la microscopie électronique à force atomique, il fut démontré que ATM lie préférentiellement les extrémités d'ADN sous forme monomérique [486]. La présence de bris double brin dans l'ADN induirait l'autophosphorylation de ATM en sérine 1981 causant alors la dissociation de l'homodimère de ATM et générant un monomère actif [487]. L'importance de cette phosphorylation lors de l'activation de ATM est cependant discutable, car la mutation de la sérine 1981 en alanine n'a aucun effet sur l'activité de la protéine [488]. Le recrutement subséquent de ATM aux sites de dommage s'effectue via le domaine C-terminal de NBS1 [489, 490] et requiert également BRCA1 [491]. Le complexe Mre11/Rad50/NBS1 (MRN) stabilise la liaison de ATM à ses substrats et est nécessaire à la liaison de ATM aux molécules d'ADN linéarisées [492, 493].

Autre membre de la famille PIKK, la protéine ATR fut découverte par homologie de séquence à ATM et à la protéine de levure Rad3 [494]. L'ablation de ATR chez la souris cause la mort embryonnaire [495, 496] tandis que les mutations entraînant une perte partielle d'activité de ATR chez l'humain furent associées au syndrome de Seckel qui partage plusieurs caractéristiques propres à l'ataxie télangiectasie [497]. ATR possède un partenaire d'interaction nommé ATRIP qui permet l'interaction avec les lésions de l'ADN [498]. Tandis que la protéine ATM est principalement activée suite aux bris double brin, la protéine ATR est stimulée par les rayonnements UV et le stress répliatif.

ATM, comme ATR, phosphoryle les résidus sérine ou thréonine, selon le consensus S/TQ, d'une multitude de protéines dont NBS1 [499], SMC1 [491, 500, 501], H2AX [502] et BRCA1 [503, 504] qui sont des médiateurs de la réponse au dommage à l'ADN. ATM phosphoryle également Artemis afin de promouvoir la réparation par NHEJ [505].

#### **5.5.1.2 Les médiateurs de la réponse au dommage à l'ADN**

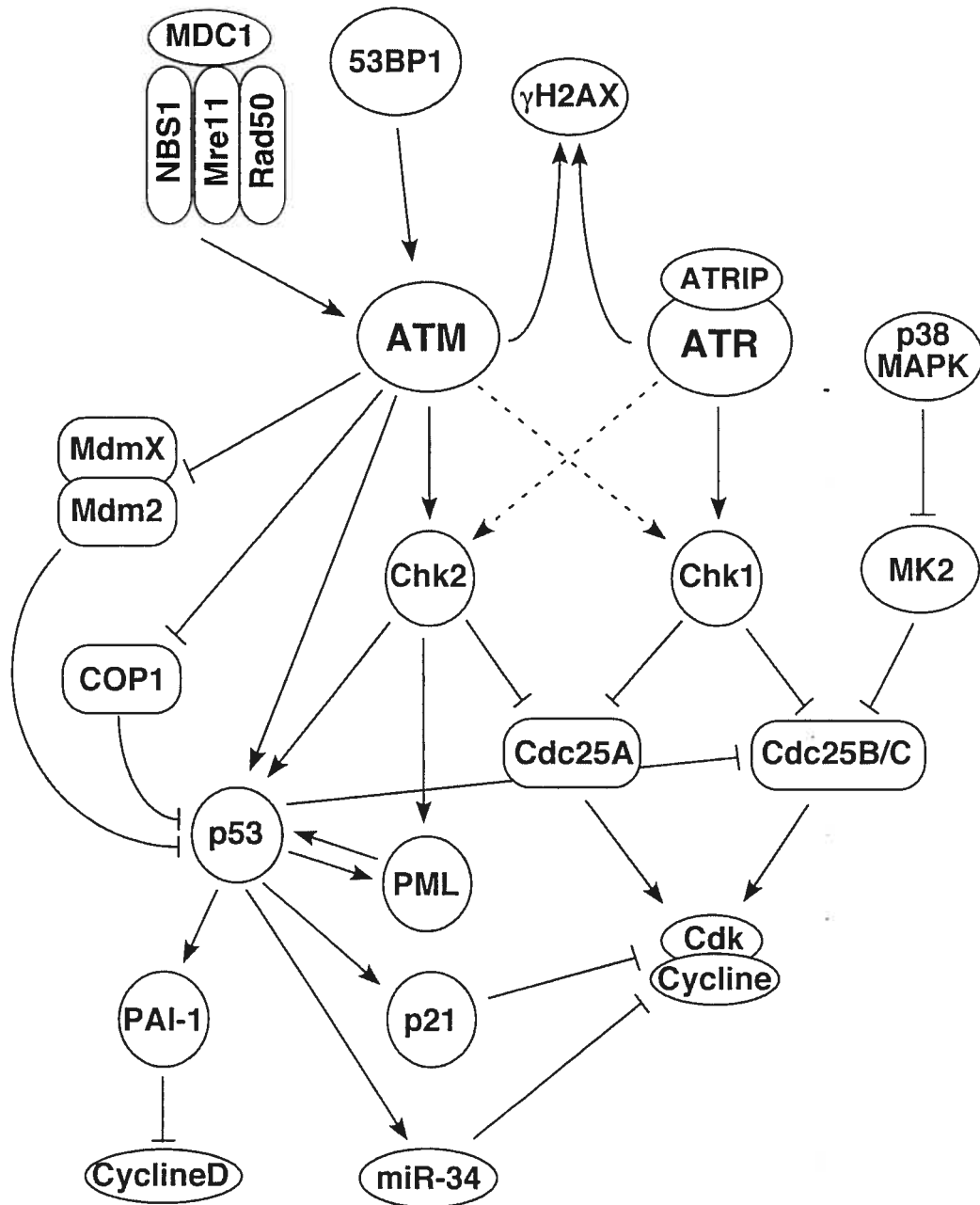
Suite à l'activation des kinases ATM et ATR, une structure protéique complexe est assemblée aux sites de dommage à l'ADN. L'élément central de la formation de ces foyers de dommage à l'ADN semble être la variante de l'histone H2A, H2AX. L'histone H2AX représente environ 10-15% du total d'histones H2A et fait partie intégrante du nucléosome [506]. Suite au bris de l'ADN, les membres de la famille PIKK phosphorylent H2AX en sérine 139 et cette modification a lieu sur une large région de la chromatine flanquant le site de dommage [502, 507]. La forme phosphorylée de H2AX est également désignée par  $\gamma$ H2AX. Lorsque cet événement de phosphorylation est absent, le recrutement des autres facteurs impliqués dans la réponse au dommage à l'ADN est perdu ou gravement compromis [508]. Les cellules isolées de souris ayant subies l'ablation du gène H2AX présentent de nombreuses aberrations chromosomiques suite à l'exposition aux rayonnements ionisants, indiquant le rôle crucial de H2AX dans la reconnaissance et la réparation des bris de l'ADN [506].

Il fut récemment démontré que le domaine BRCT (BRCA1 C-terminal) représente un élément structural capable de lier un phospho-peptide [509-512]. Or, de nombreuses protéines formant les foyers de dommage à l'ADN de façon dépendante de  $\gamma$ H2AX possèdent des domaines BRCT telles que BRCA1, 53BP1, MDC1, NBS1 et TopBP1. L'histone H2AX constitue un site d'ancrage pour la protéine MDC1 qui lie spécifiquement la forme phosphorylée  $\gamma$ H2AX [513, 514]. La protéine MDC1 est par la suite requise à la formation de foyers de réponse au dommage à l'ADN et à l'amplification du signal en permettant le recrutement de NBS1, 53BP1, BRCA1 ainsi que de la forme phosphorylée de ATM [515]. Toutefois, le recrutement initial de NBS1, BRCA1 et 53BP1 aux sites de dommage ne nécessite pas la présence de H2AX [516]. De plus, le recrutement de 53BP1 aux sites de dommage semble dépendant de la présence de deux domaines Tudor consécutifs [517, 518]. Or, les domaines Tudor permettent la liaison directe de la forme méthylée de l'histone H3 en lysine 79 suggérant un mécanisme de recrutement de 53BP1 indépendant de MDC1 [517]. Toutefois, l'accumulation efficace et soutenue de 53BP1 aux sites de dommage requiert clairement MDC1 et  $\gamma$ H2AX [506, 513, 514, 518, 519].



**Figure 6. Représentation de la voie de réponse au dommage à l'ADN.** Suite au dommage de l'ADN, les kinases ATM et ATR sont activées afin de déclencher une cascade de réponses. Principalement, ATM et ATR activent par phosphorylation les protéines Chk1 et Chk2 qui vont par la suite propager le signal. Ces kinases stimulent l'activation des effecteurs de la réponse au dommage à l'ADN qui permettent alors de freiner la progression du cycle cellulaire.

Figure 6



### 5.5.1.3 Les transducteurs du signal de la réponse au dommage à l'ADN

Chez l'humain, deux kinases, Chk1 et Chk2, jouent le rôle de transducteurs du signal et régulent le cycle cellulaire. Ces kinases furent identifiées par homologie de séquence aux protéines de levure scChk1/spChk1 [520] et scRad53/spCds1 [474, 521] respectivement. Chk1 et Chk2 sont deux sérine/thréonine kinases possédant une spécificité de substrat modérée. Le signal de bris double brin reconnu par ATM est propagé par Chk2 [474, 522] tandis que le signal de dommage généré par les rayonnements UV et reconnu par ATR est transmis par Chk1 [523]. Cependant, il existe un certain chevauchement des modes d'activation et de la fonction de Chk1 et Chk2. Par exemple, la kinase Chk1 peut être activée par ATM dans certaines conditions [524]. L'ablation de l'expression de Chk1 est létale chez la souris [525, 526], mais les souris Chk2<sup>-/-</sup> sont viables et démontrent certains défauts au niveau de l'arrêt causé par rayonnements  $\gamma$  [474]. Chez l'humain, des mutations de Chk2 causent une maladie de susceptibilité au cancer similaire au syndrome de Li-Fraumeni causé habituellement par la perte de p53 [527]. Suite aux dommages causés à l'ADN, la protéine Chk1 est phosphorylée en sérine 317 et 345 par ATR [523, 525] ou ATM [524]. Quant à Chk2, son activation passe par la phosphorylation par ATM et/ou ATR en thréonine 68 [522]. La thréonine 68 ne constitue toutefois pas l'unique site menant à l'activation de la protéine Chk2. Celle-ci possède un domaine N-terminal riche en sites S/TQ ciblés par ATM ou ATR qui semblent individuellement suffisants à l'activation de Chk2 [522, 528]. La phosphorylation des sérines 19, 33 et 35 participe à l'activation de Chk2 [529]. L'activation totale de Chk2 passe par un événement d'auto-phosphorylation en thréonine 387 qui dépend toutefois de l'intensité du dommage généré [530].

### 5.5.1.4 Les effecteurs de la réponse au dommage à l'ADN

L'activation des kinases Chk1 et Chk2 permet la stimulation des effecteurs de la réponse au dommage à l'ADN qui sont impliqués dans la régulation directe du cycle cellulaire. L'activation des points de contrôle situés en phase G1/S ou G2/M du cycle cellulaire prévient la réplication et la mitose lorsque l'ADN est endommagé. L'initiation de l'arrêt en G1 est déclenchée par la phosphorylation de la phosphatase Cdc25A en sérine 123 par Chk2 ou Chk1 causant ainsi son exclusion nucléaire et sa dégradation d'une façon dépendante de l'ubiquitine [531, 532]. L'absence d'activation de Cdc25A résulte en l'accumulation de la forme phosphorylée et inactive de Cdk2, qui est alors incapable de phosphoryler Cdc45 afin d'initier la réplication. Les phosphatases de la famille Cdc25 sont également impliquées dans la régulation de la transition G2/M du cycle cellulaire. Lorsque ATR est activée, Chk1 phosphoryle Cdc25C en sérine 216, créant un site de liaison à 14-3-3 et inhibant sa fonction [520]. Cette séquence d'événements prévient l'activation du complexe Cdc2/cycline B qui est nécessaire à l'entrée en phase M.

L'élément central du maintien du point de contrôle G1 est l'activation et la stabilisation de la protéine p53, deux processus contrôlés par les kinases ATM et ATR ainsi que par Chk1 et Chk2. ATM et ATR phosphorylent directement p53 en sérine 15 [533, 534] augmentant ainsi son activité transcriptionnelle en facilitant le recrutement de p300 [535, 536], bloquant son export nucléaire [537] et rendant p53 plus résistant à l'inhibition par son régulateur négatif Mdm2 [538]. Les kinases Chk1 et Chk2 phosphorylent quant à elles la sérine 20 de p53 réduisant l'interaction avec Mdm2 [474, 539, 540]. La phosphorylation de la sérine 20 de p53 par Chk2 demeure cependant contestée [475].

L'activation de p53 suite au dommage à l'ADN est également obtenue par stabilisation de la protéine en bloquant le potentiel inhibiteur de ses régulateurs négatifs. Suite au dommage à l'ADN, ATM phosphoryle Mdm2 en sérine 395 rendant ce dernier moins apte à promouvoir le transport nucléo-cytoplasmique et la dégradation de p53 [541]. Des études récentes montrent que MdmX coopère avec Mdm2 afin de dégrader p53 et que lors de dommages à l'ADN, la protéine MdmX est phosphorylée d'une façon dépendante de ATM et Chk2 [542]. La phosphorylation de MdmX conduit à son

importation au noyau par 14-3-3, à sa dégradation par Mdm2 et contribue à l'activation de p53 [543-545]. ATM cible aussi un autre régulateur négatif de p53, COP1, en le phosphorylant en sérine 387 et stimulant ainsi son auto-dégradation rapide [546].

La réponse au dommage à l'ADN active également des protéines impliquées dans l'activation de p53 et l'apoptose. Suite au dommage de l'ADN, la protéine PML est phosphorylée par Chk2 en sérine 117, ce qui augmente la capacité de PML à promouvoir l'apoptose induite par rayonnement  $\gamma$  [427]. Également, PML est requis pour l'activation complète de p53 suite au dommage à l'ADN [404]. De plus, Chk2 active E2F1 par phosphorylation augmentant ainsi sa stabilité, son activité transcriptionnelle et sa capacité à induire l'apoptose suite au dommage à l'ADN [547].

Bien que p53 représente l'effecteur central de la voie de réponse au dommage de l'ADN, la voie de p38MAPK/MK2 permet l'arrêt du cycle cellulaire suite au dommage de l'ADN en absence de p53 [548]. MK2 est responsable de l'établissement d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et S suite au dommage de l'ADN en absence de p53. MK2 permet cet arrêt du cycle en favorisant l'interaction entre 14-3-3 et Cdc25 afin de séquestrer Cdc25 au cytoplasme, loin des complexes cycline/CDK [548, 549].

La réponse au dommage de l'ADN est donc complexe et mène à l'activation de multiples voies afin de bloquer la progression du cycle cellulaire en présence de lésions au niveau de l'ADN. Certaines de ces voies sont d'ailleurs impliquées lors de la sénescence.

### **5.5.2 Les sénescences répllicative et liée au dysfonctionnement des télomères déclenchent une réponse de dommage à l'ADN**

Les découvertes récentes suggèrent que la voie de signalisation du dommage à l'ADN est responsable de la sénescence répllicative et de la sénescence induite par la dysfonction télomérique. De façon similaire au dommage direct de l'ADN, le raccourcissement des télomères permet de déclencher une réponse de dommage à l'ADN.

Les cellules humaines atteignant la sénescence répllicative montrent les caractéristiques moléculaires des cellules possédant des bris double brin, soit la présence de foyers nucléaires contenant  $\gamma$ H2AX, 53BP1, BRCA1, MDC1, Mre11 et NBS1 [550, 551]. Une étude rapporte toutefois que cette activation de la voie de dommage à l'ADN n'est que transitoire et disparaît lorsque les cellules sont complètement sénescents [552]. En utilisant la technique d'immunoprécipitation de la chromatine en combinaison avec différentes approches d'analyse, il fut démontré que ces foyers de dommage à l'ADN colocalisent avec les télomères [550, 553]. Les fibroblastes provenant de babouins âgés exhibent également des foyers de dommage à l'ADN au niveau des télomères [554], tout comme les fibroblastes de souris  $mTerc^{-/-}$  possédant des télomères courts [555]. La nature télomérique des foyers de dommage à l'ADN demeure cependant contestée. D'autres travaux menés avec plusieurs types de fibroblastes sénescents ainsi que des tissus de souris âgées montrent également l'accumulation de lésions au niveau de l'ADN ne colocalisant pas avec les télomères et suggèrent l'origine non-télomérique des foyers de dommage [556].

La dysfonction des télomères produite par l'expression d'un dominant négatif de TRF2, TRF2 <sup>$\Delta$ B $\Delta$ M</sup>, induit la sénescence prématurée [62] et engage également la voie de réponse de dommage à l'ADN en activant ATM [557, 558]. De plus, les télomères dysfonctionnels générés par l'expression de TRF2 <sup>$\Delta$ B $\Delta$ M</sup> sont associés aux facteurs de réponse au dommage à l'ADN dont 53BP1,  $\gamma$ H2AX, Rad17, ATM et Mre11 tout comme lors de la sénescence répllicative [550, 558]. La protéine ATM constitue la kinase majeure de cette voie dans la création de ces foyers et l'arrêt du cycle cellulaire tel que démontré grâce à l'utilisation de cellules de patients atteints d'ataxie télangiectasie [551, 558]. De plus, l'inactivation de Chk2 permet le contournement temporaire de la sénescence répllicative confirmant le rôle important de la voie de dommage à l'ADN lors de l'induction de la sénescence [553]. Ces résultats démontrent l'importance de la voie de signalisation de réponse au dommage à l'ADN dans l'établissement des sénescences répllicative et reliée au dysfonctionnement des télomères. L'activation de cette voie de signalisation lors de la

sénescence induite par les oncogènes semble également primordiale et constitue le sujet du troisième article présenté dans cette thèse.

#### **5.5.2.1 Voie de signalisation du dommage à l'ADN, télomères et sénescence**

Lors de la croissance normale des cellules, l'extrémité des télomères ne doit pas être reconnue comme un bris double brin par la voie de signalisation de la réponse au dommage à l'ADN. Le complexe shelterin/télosome ainsi que la structure en boucle t devraient donc protéger la structure télomérique et éviter le déclenchement de la réponse de dommage à l'ADN. Or, de nombreuses protéines impliquées dans la réponse du dommage à l'ADN localisent aux télomères ou semblent participer au maintien des télomères. Les cellules de patients atteints d'ataxie télangiectasie, donc dépourvues de ATM, entrent en sénescence prématurément en culture [559]. Une des évidences les plus convaincantes du rôle des facteurs de réponse au dommage à l'ADN dans le fonctionnement des télomères est l'observation que l'inactivation de ATM cause un raccourcissement accéléré des télomères chez les cellules humaines [560]. De plus, les MEFs provenant de souris  $ATM^{-/-}/Terc^{-/-}$  exhibent une érosion rapide des télomères ainsi qu'une augmentation des fusions télomériques comparativement aux MEFs  $Terc^{-/-}$  [561]. Le mécanisme moléculaire expliquant la régulation de la fonction télomérique par ATM demeure toutefois nébuleux.

Il existe néanmoins un lien entre ATM et la protéine TRF2 du complexe shelterin/télosome. TRF2 peut lier et inhiber ATM suite à la création de dommages au niveau de l'ADN [562, 563]. De façon surprenante, les foyers de dommage à l'ADN observés au niveau des télomères lors de la sénescence répllicative sont dépourvus de TRF2 [551]. TRF2 empêcherait les télomères d'être reconnus comme des lésions d'ADN. En accord avec ce modèle, la protéine POT1, dont la présence aux télomères est en partie dépendante de TRF2, bloque également la reconnaissance des télomères comme bris de l'ADN. En fait, la diminution des niveaux de POT1 induit une réponse de dommage à l'ADN ainsi qu'une réduction de la taille de l'extension télomérique simple brin [564]. L'inactivation de POT1a/b chez la souris induit également des signaux de dommages à l'ADN localisés aux télomères et ce, malgré la présence de TRF2 aux télomères [64]. Ces

données confirment la fonction importante de TRF2 et POT1 dans la protection des télomères en empêchant le déclenchement d'une réponse de dommage à l'ADN.

#### **5.5.2.2 Machinerie de réparation de bris double brin et sénescence**

Outre les facteurs de signalisation de la réponse de dommage à l'ADN, la machinerie impliquée dans la réparation des lésions causées à l'ADN jouent également un rôle important dans la conservation de la structure télomérique et lors de la sénescence. De nombreuses protéines sont impliquées dans la réparation de bris double brin par liaison non-homologue des extrémités (NHEJ) dont DNA-PKcs, Ku70, Ku80, XRCC4-DNA ligase IV et Artemis (revue dans [565]). Ku70 et Ku80 forment des hétérodimères liant directement les bris double brin et permettent le recrutement de DNA-PK et Artemis. Artemis est une endonucléase préparant les extrémités d'ADN pour la ligation subséquente par XRCC4-DNA ligase IV. Il est intéressant de noter que les MEFs n'exprimant pas Ku80 [566], Ku70 [567], XRCC4 [568] ou DNA ligase IV [569] entrent en sénescence prématurément. Dans le cas de la réparation des bris d'ADN par NHEJ, l'entrée en sénescence accélérée corrèle donc avec l'incapacité à réparer les dommages et avec l'instabilité génomique. En plus de leur rôle dans la réparation des lésions double brin, trois des facteurs impliqués dans le NHEJ, soit Ku70, Ku80 et DNA-PKcs localisent aux télomères [570, 571]. De plus, les protéines Ku interagissent avec TRF1 et TRF2 permettant de croire qu'elles régulent la taille des télomères et les protègent [572]. L'inactivation d'un allèle de Ku80 résulte en un raccourcissement des télomères [573]. La délétion de Ku70, Ku80, DNA-PKcs ou de Artemis est associée à une augmentation de la fréquence des fusions des extrémités des chromosomes [574], suggérant le rôle de ces facteurs dans le maintien de la structure télomérique.

L'inactivation de la kinase de la famille PIKK, DNA-PKcs, induit des fusions télomériques en absence de raccourcissement notable des télomères, suggérant qu'elle pourrait être impliquée dans la coiffe des télomères [575-577]. De plus, la perte de séquences télomériques s'effectue plus rapidement chez les souris DNA-PKcs<sup>-/-</sup>/Terc<sup>-/-</sup>



comparativement aux souris *Terc*<sup>-/-</sup> confirmant la fonction cruciale de DNA-PKcs aux télomères [576].

La réparation des bris double brin peut également s'effectuer par recombinaison homologue. Le produit du gène de susceptibilité au cancer du sein *BRCA1* interagit et colocalise avec Rad51 aux sites de bris double brin [578]. L'absence de *BRCA1* mène à une diminution de l'efficacité de réparation par recombinaison homologue suggérant un rôle important joué par *BRCA1* lors de ce type de réparation. Le mécanisme par lequel *BRCA1* participe à la réparation par recombinaison homologue demeure cependant nébuleux. Toutefois, bien que l'ablation de *BRCA1* cause la létalité embryonnaire, l'inactivation partielle de *BRCA1* chez la souris cause la sénescence prématurée de l'embryon et des MEFs [579].

#### 5.5.2.3 Machinerie de réparation de bris simple brin et sénescence

Les bris causant des lésions sur un seul des brins de l'ADN sont habituellement réparés par excision de nucléotides (NER) ou excision de bases (BER). Bien que le mécanisme BER joue une fonction importante dans la réparation, la mutation de gènes impliqués dans cette voie ne semble pas être liée à la sénescence à l'exception de *SirT6*. Bien que la fonction précise de *SirT6* dans le mécanisme de BER demeure inconnue, les souris *SirT6*<sup>-/-</sup> développent un syndrome de vieillissement prématuré. Toutefois, on ne sait pas si les MEFs *SirT6*<sup>-/-</sup> entrent en sénescence prématurément [580].

L'altération de facteurs impliqués dans le NER induit différents syndromes de sénescence prématurée chez l'homme et la souris. La machinerie de base de réparation par excision de nucléotides est composée des protéines XPA à XPG, de CSA et CSB ainsi que du facteur de transcription TFIIH. Le NER se divise en deux voies : le NER génomique global (GG-NER) et le NER couplé à la transcription (TC-NER). Les facteurs spécifiques du GG-NER, XPC et XPE sont impliqués dans la reconnaissance des lésions tordant l'hélice d'ADN tandis que les facteurs spécifiques au TC-NER, CSA et CSB, sont responsables de la réparation dans les régions transcrites en permettant le déplacement de la polymérase arrêtée afin de permettre l'accès à la machinerie de réparation. ERCC1 est une

endonucléase qui, avec XPF, crée des incisions simple brin de chaque côté de la lésion d'ADN afin de retirer le dommage. L'ablation de ERCC1 chez la souris résulte en des problèmes de réparation et à l'apparition du phénotype de vieillissement prématuré. De plus, les MEFs ERCC1<sup>-/-</sup> montrent une apparition précoce des marqueurs de la sénescence en culture [581].

#### 5.5.2.4 Syndrome de Werner et sénescence

Le syndrome de Werner constitue un excellent modèle de vieillissement prématuré chez l'humain. Le gène défectif chez les patients atteints de ce syndrome, *WRN*, code pour une hélicase de la famille RecQ (RecQL2) [582]. WRN possède également un domaine exonucléase. Les fibroblastes de patients atteints du syndrome de Werner entrent en sénescence prématurément lorsque mis en culture [583]. Cette sénescence prématurée est abolie par l'expression de la télomérase permettant de croire que WRN est impliqué dans le maintien de la structure télomérique [584]. La souris déficiente en WRN ne reproduit pas le phénotype observé chez l'humain, car les télomères de la souris sont de très grande taille. Toutefois, les souris doublement déficientes WRN<sup>-/-</sup>/Terc<sup>-/-</sup> reproduit le syndrome de Werner observé chez l'humain [585]. WRN interagit également avec TRF2 et peut dérouler et dégrader la structure télomérique en boucle D [586, 587]. Cette observation suggère que WRN pourrait permettre l'accès aux télomères à différents facteurs impliqués dans le maintien de cette structure.

On note des niveaux élevés de WRN chez les cellules immortalisées ainsi que chez certaines lignées tumorales humaines suggérant l'implication de WRN lors de la tumorigenèse [588]. L'oncoprotéine Myc stimule directement la transcription de WRN [269]. De plus, l'expression de Myc dans des fibroblastes de patients atteints du syndrome de Werner ou après déplétion de WRN induit la sénescence [269]. La protéine WRN limite donc la sénescence cellulaire induite par Myc.

Ces données indiquent que les protéines responsables de la réparation des dommages de l'ADN ainsi que la voie de réponse suite aux dommages sont impliquées

dans la régulation de la sénescence. Le rôle de la voie de réponse au dommage à l'ADN lors de la sénescence induite par les oncogènes constitue donc un sujet d'étude très intéressant.

## **6 La sénescence constitue un mécanisme de suppression tumorale**

### **6.1 La sénescence : mécanisme de suppression tumorale alternatif à l'apoptose**

La sénescence et l'apoptose sont deux mécanismes de suppression tumorale complémentaires et permettent de freiner la progression tumorale lorsque l'une ou l'autre est inactivée. Par exemple, l'inhibition de l'apoptose induite par certaines drogues, suite à l'expression de Bcl-2 ou d'inhibiteurs des caspases, cause alors l'entrée en sénescence [589, 590].

Plusieurs données suggèrent que la sénescence constitue un mécanisme cellulaire de suppression tumorale. Tout d'abord, la sénescence peut être déclenchée en réponse à la prolifération aberrante induite par les oncogènes [96, 99, 100, 111]. Deuxièmement, l'établissement de la sénescence requiert la participation de suppresseurs tumoraux et différentes oncoprotéines virales permettent de bloquer l'entrée en sénescence [90, 96, 355]. Finalement, le contournement de la sénescence augmente la susceptibilité des cellules à la transformation [12]. La sénescence représente donc une barrière permettant de freiner la prolifération incontrôlée des cellules normales.

### **6.2 La sénescence : mécanisme de suppression tumorale *in vivo***

Jusqu'à récemment, peu de données permettaient de croire que la sénescence observée *in vitro* suite à l'introduction d'oncogènes pourrait constituer un mécanisme de suppression tumorale *in vivo*. Par exemple, la présence d'une activité SA- $\beta$ -gal avait déjà

été détectée *in vivo* dans des échantillons d'hyperplasie bénigne de la prostate suggérant que la sénescence empêche l'acquisition d'un caractère malin [591]. Par la suite, il fut démontré que la perte de PTEN déclenche un phénotype de sénescence dépendant de p53 permettant d'empêcher la tumorigenèse de la prostate [592]. Quelques autres articles relatent l'importance de la sénescence comme mécanisme s'opposant à la transformation *in vivo*. La sénescence a donc été également observée dans des tumeurs pré-malignes induites par l'oncogène Ras [261], dans des naevi humains fréquemment associés à l'activation de Raf [259] ainsi que dans des papillomes induits selon un protocole impliquant le DMBA [108]. De plus, l'utilisation d'un modèle de souris transgénique de lymphome a démontré que la sénescence induite suite à l'expression de l'oncogène Ras dépend de la méthyltransférase de l'histone Suv39h1 et représente une barrière au développement du cancer *in vivo* [593]. L'étude d'un système similaire de développement de lymphome a aussi permis de démontrer que la sénescence est un mécanisme impliqué lors de la réponse à la chimiothérapie lorsque la voie de l'apoptose est bloquée [589]. L'utilisation de ce système de développement de lymphome a également permis de démontrer que la sénescence déclenchée par des télomères courts freine la progression tumorale [594, 659].

Le modèle de sénescence cellulaire *in vitro* constitue donc un modèle pertinent d'étude des mécanismes de suppression tumorale déclenchés *in vivo*.

## HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

En 2001, lors de mon arrivée au laboratoire, il était clair que les voies de suppression tumorale de p53 et Rb constituaient les voies cruciales menant à l'établissement de la sénescence. Toutefois, peu d'outils permettaient d'étudier indépendamment ces deux voies. La plupart des études effectuées impliquaient l'utilisation des oncoprotéines virales E1A et antigène T afin de démontrer l'importance des voies de Rb et p53 lors de la sénescence. De plus, la plupart des études menées sur les mécanismes moléculaires responsables de la sénescence par PML pointaient p53 comme régulateur principal [90, 165, 465, 466]. Toutefois, ces études ne démontrent pas la nécessité de p53 lors du programme de sénescence lancé par PML. Il était donc important d'étudier la contribution relative de p53 et de Rb lors de la sénescence induite par PML.

De plus, à ce moment, on ne connaissait que peu d'oncogènes capables d'induire la sénescence dans les cellules normales. À la recherche de nouveaux oncogènes menant au phénotype de sénescence, nous avons choisi d'étudier l'oncogène STAT5 dont les niveaux d'ARNm étaient largement augmentés lors de la sénescence induite par Ras (données non publiées, G.F.). L'oncogène STAT5 est constitutivement activé dans de nombreux cancers dont différents types de leucémies [595-597], le cancer de la prostate [598, 599], du sein [600, 601] et de la tête et du cou [602]. STAT5 induit la prolifération par l'augmentation de cycline D et inhibe également l'apoptose par la régulation des niveaux de Bcl-X<sub>L</sub> [603]. Nous avons alors posé l'hypothèse que la sénescence constituait un mécanisme de suppression tumorale alternatif permettant de bloquer la prolifération des cellules activée par des oncogènes possédant une activité anti-apoptotique.

Bien que les voies de suppression tumorale de p53 et Rb constituent des points centraux des mécanismes moléculaires menant à la sénescence induite par les oncogènes, les événements permettant de détecter le stress oncogénique et d'activer ces deux voies cruciales sont tout aussi importants. Chez la souris, p19<sup>ARF</sup> semble jouer ce rôle et est activé

par de nombreux stimuli oncogéniques [270, 274, 604]. De plus, p19<sup>ARF</sup> est nécessaire à l'activation de p53 et à l'induction de la sénescence par Ras chez les MEFs [219, 264]. Toutefois, p14<sup>ARF</sup> ne semble pas être aussi important chez les cellules humaines. En fait, Ras ne requiert pas p14<sup>ARF</sup> afin d'activer p53 et d'induire la sénescence [350]. Il était donc important de déterminer le senseur du stress oncogénique responsable de l'activation de p53 chez les cellules humaines. En observant les différents types de sénescence connus, soit la sénescence répllicative, la sénescence liée à la dysfonction des télomères, la sénescence induite par stress oxydatif et la sénescence induite par différents agents chimiothérapeutiques, il était logique de stipuler que l'élément commun à tous ces types de sénescence était la présence de signaux de dommages à l'ADN. Il devenait donc pressant de déterminer l'importance de la voie de signalisation de dommage à l'ADN lors de la sénescence induite par les oncogènes ainsi que son rôle dans l'activation de p53 chez les cellules humaines.

## RÉSULTATS

### **ARTICLE 1: Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence**

#### **Mise en contexte**

L'interaction fonctionnelle entre PML, p53 et Rb suggère de nombreux mécanismes par lesquels PML pourrait induire la sénescence dans les cellules humaines. Bien que chez la souris la dépendance de p53 lors de l'induction de la sénescence par PML soit évidente, l'importance relative des voies de p53 et Rb n'est toujours pas claire chez l'humain.

La présente étude permet l'analyse indépendante des voies de p53 et Rb lors de la sénescence induite par PML grâce à l'utilisation des oncoprotéines virales E6 et E7. Ces outils ont permis de démontrer que PML ne dépend pas de p53, mais bien de Rb afin d'induire la sénescence dans les cellules humaines.

Cet article a été publié en janvier 2004 dans *Oncogene* aux pages 91-99.

Note: Contribution(s) des auteurs:

FAM: Culture cellulaire et infection des cellules primaires, immunofluorescences de PML, essais de prolifération, essais SA- $\beta$ -Gal et participation à l'écriture du manuscrit.

SG: Immunofluorescences de PML, p53 et Rb.

MFGL: Immunobuvardages et aide pour la culture cellulaire.

OM: Immunobuvardages.

GF: Courbes de croissance des IMR90/dnp53, supervision générale et écriture du manuscrit.

# **Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors but not p53 for PML-induced senescence**

Frédéric A. Mallette\*, Stéphane Goumard\*, Marie-France Gaumont-Leclerc, Olga Moiseeva and Gerardo Ferbeyre.

Université de Montréal, Département de biochimie, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

\* Contributed equally

Short title: PML-induced senescence and Rb.

Keywords: Senescence, nuclear bodies, E6, E7, Rb, p53, PML.

Correspondence to:

Gerardo Ferbeyre, MD, PhD

Université de Montréal

Département de biochimie, E-515

C.P. 6128, Succ. Centre-Ville

Montréal, Qc H3C 3J7

CANADA

Phone: 514 343-7571

Fax: 514 343-2210

Email: [g.ferbeyre@umontreal.ca](mailto:g.ferbeyre@umontreal.ca)

Delivery :

Département de Biochimie

Université de Montréal

Pavillon Principal, A-533

2900 Édouard Montpetit

Montréal, Québec H3T 1J4

Canada



## Abstract

Cellular senescence is a permanent cell cycle arrest that can be triggered by a variety of stresses including short telomeres and activated oncogenes. PML (promyelocytic leukemia protein) is a central component of the senescence response and is able to trigger the process when overexpressed in human diploid fibroblasts (HDFs). Senescence induced by PML in HDFs is characterized by a modest increase in p53 levels and activity, the accumulation of hypophosphorylated Rb and a reduced expression of E2F dependent genes. To dissect the p53 and Rb family requirements for PML-induced senescence, we used the oncoproteins E6 and E7 from human papillomavirus type 16. We found that the co-expression of E6 and E7 inhibited the growth arrest and senescence induced by PML. In addition, these viral oncoproteins blocked the formation of PML bodies and excluded both p53 and Rb from PML bodies. Expression of dominant negative p53 alone failed to block PML-induced senescence and expression of E6 only delayed the process. On the other hand, expression of E7 was sufficient to block PML-induced senescence while an E7 mutant unable to bind Rb did not. Together, these data indicate that PML-induced senescence engages the Rb tumor suppressor pathway predominantly.

## Introduction

Human diploid fibroblasts (HDFs) respond to a variety of stresses by entering into a metabolically active cell cycle arrest characterized by flat morphology and specific changes of gene expression (Campisi, 2001; Serrano & Blasco, 2001). This phenotype, known as cellular senescence was first observed after serial passage of HDFs in culture (Hayflick & Moorhead, 1961). Senescence can be also induced by oncogenes and DNA damaging agents suggesting that it plays a role as a tumor suppressor mechanism, blocking the expansion of cells with the potential of becoming malignantly transformed (Campisi, 2001; Serrano & Blasco, 2001). Consistent with this idea, establishment of the senescent arrest in response to a variety of stressors depends on the p53 and the Rb tumor suppressor pathways (Campisi, 2001; Serrano & Blasco, 2001). Accordingly, most genes found to regulate senescence (i.e. p21, INGI, p16<sup>INK4a</sup>) can be placed either upstream or downstream p53 or the Rb family of tumor suppressors (Chang et al., 2000; Garkavtsev & Riabowol, 1997; Hara et al., 1996; Macip et al., 2002; Palmero et al., 1997; Young & Smith, 2001).

Definitive proof for the involvement of the Rb and the p53 tumor suppressor pathways in senescence has been obtained in cells from different knockout mice (Dannenbergh et al., 2000; Lin & Lowe, 2001; Peeper et al., 2001; Sage et al., 2000; Serrano et al., 1997). However, for technical reasons, similar experiments have not been published so far in human cells. Hence, the role of the p53 and Rb tumor suppressor pathways in human cells has been inferred from correlative evidence or the use of several viral oncoproteins that inactivate these tumor suppressor pathways (Campisi, 2001). For example, simultaneous inhibition of both p53 and Rb by the viral oncoproteins, large T from SV40, E1A from adenovirus or E6/E7 from papillomavirus can inhibit the senescent arrest triggered by oncogenes and delay the arrest activated by short telomeres in human fibroblasts and keratinocytes (Hahn et al., 2002; Kiyono et al., 1998; Rheinwald et al., 2002; Serrano et al., 1997).

Recent results indicate that the control of cellular senescence is different between human and mouse cells, suggesting that the results obtained in a mouse model should not be extrapolated to human cells. For example, in HDFs, serial passage induces senescence through telomere shortening, a process that provides a signal mimicking broken DNA ends (Greider, 1998; Harley et al., 1990; Sedivy, 1998). In mouse fibroblasts, serial passage triggers senescence not due to telomere attrition but to the stress of the culture conditions (culture shock) (Sherr & DePinho, 2000). Moreover, induction of senescence by oncogenic *ras* or telomere de-protection requires p53 in mouse cells but not in HDFs (Serrano & Blasco, 2001; Serrano et al., 1997; Smogorzewska & de Lange, 2002).

Senescence induced by short telomeres or oncogenic *ras*, both in mouse and human cells, activates another candidate tumor suppressor known as promyelocytic leukemia protein or PML (Ferbeyre et al., 2000; Pearson et al., 2000). PML was originally discovered as a translocation partner of the  $RAR\alpha$  gene in patients with acute promyelocytic leukemia (reviewed in Melnick & Licht, 1999; Salomoni & Pandolfi, 2002). Enforced expression of PML is sufficient to trigger senescence both in human and mouse fibroblasts, suggesting that it is an important component of the senescence pathway. In mouse fibroblasts, p53 is essential for PML-induced senescence and colocalizes with PML and CBP into PML bodies (Pearson et al., 2000), also known as PODs for PML oncogenic domains. PML-induced senescence in HDFs was accompanied by a modest increase in p53 levels, activity and several post-translational modifications of p53 (Bischof et al., 2002; Ferbeyre et al., 2000; Pearson et al., 2000). In addition, PML-induced senescence was blocked by enforced expression of the p53 deacetylase SIRT1 (Langley et al., 2002). Together, these reports suggest that in human cells p53 functions are also important for PML-induced senescence but they do not attest whether p53 is actually required for the process. PML-induced senescence in HDFs is also characterized by the accumulation of hypophosphorylated Rb and the colocalization of a fraction of the Rb protein into PML

bodies (Ferbeyre et al., 2000). Again, it is not known whether the Rb pathway is essential for the establishment of PML-induced senescence.

Here we study the p53 and the Rb family requirements for PML-induced senescence in human cells by using the human papillomavirus type 16 (HPV16) proteins E6 and E7. E6 promotes p53 degradation through the proteasome (reviewed by Mantovani & Banks, 2001) while E7 binds to pocket proteins (Rb, p107, p130) and interferes with their ability to block E2F dependent gene expression (reviewed by Munger et al., 2001). We show that co-expression of E6 and E7 efficiently blocked PML-induced senescence. Surprisingly, expression of E7 alone was also sufficient to bypass PML-induced senescence, while expression of E6 or dominant negative p53 did not. The ability of E7 to bypass PML-induced senescence required binding and inactivation of pocket proteins because a well-known mutant of E7 unable to bind these proteins was also inactive for blocking PML-induced senescence. Together, these results contrast those published using mouse fibroblasts and suggest that in HDFs, PML-induced senescence predominantly engages the Rb tumor suppressor pathway.

## Results

### Expression of E6 and E7 blocks PML-induced senescence in human diploid fibroblasts

To investigate whether PML-induced senescence requires p53 and Rb family functions we introduced the viral oncoproteins E6 and E7 into the human diploid fibroblasts IMR90. The populations of cells expressing E6/E7 or the empty vector LXS<sub>N</sub> were then infected with retroviruses that express PML, oncogenic Ras or a control vector. As previously reported (Ferbeyre et al., 2000; Pearson et al., 2000), PML-expressing cells arrested proliferation shortly after selection (Figure 1A,B) and remained arrested with features of cellular senescence, that is, a flat cell morphology and positive staining for the senescence associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) (Figure 1C,D). However, expression of PML in HDFs expressing E6/E7 did not lead to cell cycle arrest or senescent features (Figure 1). In contrast to PML, Ras-V12 induced a permanent growth arrest in IMR90 cells expressing either the control vector LXS<sub>N</sub> or E6/E7 (Figure 1A,C, D). On the other hand, the percent of SA- $\beta$ -gal positive cells induced by Ras-V12 was significantly lower in cells expressing E6/E7, suggesting that these viral oncoproteins partially inhibited the senescent program induced by oncogenic *ras* without affecting the cell cycle arrest (Figure 1C,D). Accordingly, SV40 large T, which also inactivates p53 and Rb, requires perturbation of Protein Phosphatase 2A by SV40 small t to completely rescue cells from Ras-induced senescence (Hahn et al., 2002).

As reported previously, we found that expression of Ras-V12 or PML in HDFs increased the number and size of PODs (Figure 1E and Table 1). In cells expressing E6/E7, the number of PODs were reduced from around 26 in cells expressing Ras-V12 or PML to 13-14 PODs per cell, which is the number typically found in growing fibroblasts (Figure 1E and Table 1). Enforced expression of PML or Ras-V12 increased the size of PODs and this

increase was also inhibited in cells expressing E6/E7 (Table 1). Hence, E6 and E7 were sufficient to fully bypass the senescent cell cycle arrest induced by enforced expression of the PML protein.

### **The colocalization of p53 and Rb with PML is impaired in cells expressing E6 and E7**

During senescence induced by short telomeres, Ras-V12 or PML, a fraction of the tumor suppressor proteins p53 and Rb localize to PODs (Ferbeyre et al., 2000; Pearson et al., 2000). To investigate whether the viral oncoproteins E6 and E7 alter the functions of PODs during senescence, we studied the levels and localization of PML, Rb and p53 in HDFs expressing these oncoproteins. In cells expressing PML, we observed that staining for endogenous p53 also stained the PML bodies. Hence, most visualized PML bodies contained p53 immunoreactive material (Figure 2A).

Similarly, we found that a significant fraction of endogenous Rb localized with PML into PODs (Figure 2B). Moreover, we noticed that approximately 16% of the cells displayed very large PML bodies (mean size of 150 pixels), doubling the size of the PODs seen in the rest of the cells, which have a size of approximately 75 pixels. In cells with large PODs, the anti-Rb antibody was able to stain the PODs like the anti-PML antibody (Figure 2B third lane). The association of p53 and Rb with PML bodies was not observed in cells expressing E6 and E7 (Figure 2A and B). Few PML bodies were observed in these cells and none of them contained p53 or Rb immunoreactive material, even in pictures taken with longer expositions. To better show the loss of the colocalization of p53 and Rb with PML in cells expressing E6/E7 and PML we enlarged and deconvoluted the frames corresponding to p53 and Rb staining in these cells and the corresponding controls (Figure 2C). Both p53 and Rb show a granular pattern of staining in the control cells that corresponds in part with the PML staining seen in Figures 2A and 2B. In cells expressing

E6 and E7, the p53- and Rb-staining are largely homogenous. Therefore, in cells expressing E6 and E7, PML does not form nuclear bodies as efficiently as in normal cells and p53 and Rb are evenly localized in the nucleus.

### **E7 rescues HDFs from PML-induced senescence**

To investigate the relative contribution of the p53 and the Rb pathways to PML-induced senescence, we co-expressed PML with either E6 or E7 in HDFs. First, we infected HDFs with the LXS<sub>N</sub> (control vector) or its derivatives LXSNE6 or LXSNE7. Populations infected with these viruses were then infected with pLPC retrovirus or its derivative expressing PML. In cells with the empty vector, PML induced a growth arrest (Figure 3A) with the characteristics of cellular senescence (Figure 3B and C). In cells expressing E6, PML-induced senescence was delayed (Figure 3B) and the number of cells expressing SA- $\beta$ -gal was reduced. Hence, E6 partially suppressed the senescence phenotype induced by PML. In cell populations co-expressing E7 and PML, growth arrest did not occur (Figure 3A) but the growth rate was slightly slower than in cells expressing E7 alone or cells expressing PML with both E6 and E7. This reduction in growth correlated with the ability of E7 to induce p53 and cell death (See Figure 6 below and Supplementary Figure S1). Thus, E7 but not E6 rescues HDFs from PML-induced senescence. We also study the individual effect of E6 and E7 on PML bodies. Neither E6 nor E7 was able to reduce the ability of PML to form PODs (Supplementary Figure S2 and Table SI). Therefore, E7 rescues PML-induced senescence by acting downstream or at the level of PML bodies.

E7 is mainly known for its ability to inhibit the functions of the Rb family of tumor suppressors. However, E7 binds other targets (Munger et al., 2001) and in principle its ability to inhibit PML-induced senescence might be Rb-independent. To evaluate whether Rb-binding by E7 is essential to inhibit PML-induced senescence we used a well known E7 mutant (E7 $\Delta$ 21-24) unable to bind the Rb family of pocket proteins, but conserving intact

other functions of E7 (Helt & Galloway, 2001). Cells expressing this mutant entered senescence in response to PML with higher efficiency than wild type HDFs according to a  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation assay (Figure 4A) that measures cell cycle arrest, and to the SA- $\beta$ -gal assay that measures senescence (Figure 4B and C). Therefore, the ability of E7 to bypass PML-induced senescence requires inactivation of the Rb tumor suppressor pathway.

### **A dominant negative p53 does not block PML-induced senescence**

Although E6 was unable to rescue PML-induced senescence, it was able to delay the cell cycle arrest and to reduce the number of cells stained for SA- $\beta$ -gal. This could be secondary to inactivation of p53 or another target of E6 (Mantovani & Banks, 2001). To clear this point, we further examined the role of the p53 pathway in PML-induced senescence by using a dominant negative p53 allele *p53<sup>175H</sup>* (dnp53). Expression of PML in cells expressing dnp53 induced a cell cycle arrest with the characteristics of cellular senescence that was indistinguishable from the senescence observed in control cells (Figure 5A and B). To verify that dnp53 was effectively blocking p53, we infected the cells expressing dnp53 with a p14<sup>ARF</sup> expressing retrovirus. In control IMR90 cells with an empty vector (pWZLHygro), p14<sup>ARF</sup> induced a premature senescence accompanied with high p53 activity (Figure 5) (Stott et al., 1998). However, in cells expressing dnp53, p14<sup>ARF</sup> failed to induce senescence (Figure 5). Together these results suggest that p53 is not required for PML-induced senescence and that the effects of E6 in delaying the process is probably related to the inhibition of other targets by E6.



## **Cell cycle regulators in PML-induced senescence and in cells expressing HPV oncoproteins**

Since E6 and E7 are known for their ability to disrupt the functions of p53 and the Rb family respectively, we investigated the state of these tumor suppressors in cells expressing PML alone or in combination with E6, E7 or E6/E7 (Figure 6). Expression of PML in IMR90 cells bearing the control vector LXS<sub>N</sub> caused a modest but reproducible increase in p53 levels and its downstream target p21 (Figure 6, lanes 1 and 2). As expected, expression of E6/E7 triggered a dramatic reduction of p53 and p21 levels, both in control cells and in cells expressing PML (lanes 7 and 8). Expression of E6 alone was sufficient to reduce p53 levels and induction of p21 (lanes 3 and 4). In contrast, E7-expressing cells displayed high levels of p53 and p21 that were further increased in PML expressing cells (lanes 5 and 6). The high p53 levels and activity in E7-expressing cells are consistent with the increased frequency of cell death observed in these cells (Supplementary Figure S1). This was also observed in cells expressing E7 $\Delta$ 21-24 (data not shown). On the other hand, this p53 response in E7-expressing cells does not interfere with the ability of E7 to block PML-induced senescence. Expression of PML in IMR90 cells with the empty vector LXS<sub>N</sub> resulted in an important reduction of the hyperphosphorylated form of Rb (pRb) (lane 2) and an accumulation of the hypophosphorylated form (lanes 2 and 4). Proliferating cells predominantly displayed the hyperphosphorylated form of Rb (lanes 1, 3 and 5-8). This is not due to a reduction in the levels of any of the kinases known to phosphorylate Rb (CDKs 2, 4 and 6) since their levels were not affected by PML. The lower levels of Rb protein observed during senescence induced by PML (lane 2 vs. 1) might reflect the fact that hypophosphorylated Rb is normally attached to an insoluble nuclear fraction and is thus, very difficult to solubilize. Low levels of Rb protein in total cell extracts were also reported during senescence induced by Ras, Raf or PML (Serrano et al 1997; Lin et al 1998; Ferbeyre et al 2000). Hence, PML engages the Rb pathway by promoting the accumulation

of the active hypophosphorylated form of Rb. and expression of E6/E7 or E7 alone blocked the ability of PML to reduce Rb phosphorylation.

For additional characterization of the Rb pathway we measured the levels of the E2F target genes Cyclin A and Mcm6. As expected, PML reduced the levels of these proteins in control normal fibroblasts (lanes 1 and 2). PML also reduced the levels of Cyclin A and Mcm6 in cells expressing E6 (lanes 3 and 4) but failed to do so in cells expressing E7 or E6/E7 (lanes 5 to 8). Note that these two proteins are highly up-regulated in cells expressing E7. These results are consistent with the idea that these genes are repressed in an Rb family-dependent manner during PML-induced senescence. Importantly, since Mcm6 is an E2F-target gene expressed in G1, its levels reflects better the Rb-dependent repression in this stage of the cell cycle (Heidebrecht et al., 2001). Finally, PML-induced senescence is not accompanied by activation of the p38 MAP kinase (Figure 6) as observed during *ras*-induced senescence (Haq et al., 2002; Iwasa et al., 2003; Wang et al., 2002). This is in agreement with the idea of PML being downstream of both Ras and p38 MAP kinase in the senescence-signaling pathway activated by Ras. Therefore, both the genetic studies and the biochemical analysis indicate that PML-induced senescence in human cells predominantly engages the Rb tumor suppressor pathway.

## Discussion

Here we report that the oncoproteins E6 and E7 from HPV16 block the senescence program induced by PML. The effects of E6/E7 are thus reminiscent of those previously observed with the E1A oncoprotein from adenovirus, which also blocks senescence in response to oncogenic Ras or PML (Ferbeyre et al., 2000; Serrano et al., 1997). E1A shares with E7 the ability to bind and disrupt the functions of the Rb family proteins (pRb, p107 and p130) and cooperates with oncogenic *ras* to transform primary cells (Phelps et al., 1988). E1A shares with E6 an ability to inhibit p53, although through a distinct mechanism. E1A opposes p53 activity by binding to the p53 co-activator p300 (Lill et al., 1997) while E6 leads to p53 degradation (Mantovani & Banks, 2001). One advantage of the HPV oncoproteins over E1A to dissect the functions of tumor suppressor pathways is that the relative contributions of the Rb and the p53 pathways can be easily studied by expressing E6 and E7 separately. Surprisingly, we found that expression of E7 alone, but not of E6 or of a dominant negative p53, was sufficient to block PML-induced senescence, indicating that in human fibroblasts, the p53 pathway is not essential for PML-induced senescence. Given the extensive literature implicating p53 in the senescent response of fibroblasts (Campisi, 2001; Gollahon et al., 1998) our results were surprising. However, p53 was reported to be non-essential for the senescent response of human fibroblasts to oncogenic *ras* (Serrano et al., 1997) or telomere deprotection (Smogorzewska & de Lange, 2002). Also, p53 null human cells from patients with Li-Fraumeni syndrome are not defective in replicative senescence (Medcalf et al., 1996). Together, these data support our conclusion that p53 is not required for the senescent cell cycle arrest of HDFs in response to enforced expression of PML.

The ability of E7 to bypass PML-induced senescence seems to be the result of blocking the Rb pathway. Correspondingly, an E7 mutant known for its defect in binding and blocking the Rb family of proteins was unable to inhibit PML-induced senescence.

Paradoxically, in HDFs, we found that E7 induced p53 levels and activity and this was accompanied by increased cell death. However, despite this p53 response, cells expressing E7 did not arrest cell proliferation. This could be explained by the ability of E7 to promote an Akt-dependent phosphorylation of p21, preventing its nuclear localization and functions (Westbrook et al., 2002). Also, the Rb pathway seems to function downstream the p53 pathway in cell cycle regulation as demonstrated in mouse cells with genetic ablation of all three pocket proteins. These cells failed to enter senescence after serial passage or enforced expression of oncogenic *ras* despite the presence of activated p53 (Dannenberg et al., 2000, Peeper et al., 2001, Sage et al., 2000). Of interest, HDFs deficient for the Rb regulator p16<sup>INK4a</sup> are resistant to Ras-induced senescence (Brookes et al., 2002) and it would be relevant to study whether these cells can enter senescence in response to PML. Since PML is downstream of Ras in Ras-induced senescence, collectively, these data suggest a predominant role for the Rb pathway over the p53 pathway in PML-induced senescence in human cells. In agreement, re-introduction of Rb into Rb-deficient tumor cell lines induced a senescent cell cycle arrest in the absence of functional p53 (Xu et al., 1997).

In Figure 7, we propose a model that takes into account the results coming from studies on both mouse and human cell lines. In murine fibroblasts, the p53 and the Rb pathways are both essential for Ras- or PML-induced senescence, and as proposed before (Dannenberg et al., 2000, Peeper et al., 2001, Sage et al., 2000), p53 is upstream the Rb family of proteins. Hence, blocking either p53 or the Rb family of proteins bypasses senescence in mouse cells. In human cells, the contribution of the p53 pathway is not essential and both Ras (Brookes et al., 2002; Ferbeyre et al., 2000; Serrano et al., 1997) and PML can engage a senescent program that requires an intact Rb pathway. This model does not deny a role for p53 as a tumor suppressor against oncogenic stimuli or an ability of p53 itself to regulate senescence. In fact, the transformation of human primary cells by oncogenic *ras* clearly requires the inhibition of p53 functions (Hahn et al., 2002) and both Ras and PML induce p53 activity in these cells (Ferbeyre et al., 2000; Pearson et al., 2000; Serrano et al., 1997). Also, p14<sup>ARF</sup>, E2F1 and  $\beta$ -catenin required an intact p53 pathway to

induce senescence (Damalas et al., 2001; Dimri et al., 2000; Stott et al., 1998). However, the model does suggest that the senescent phenotype is a direct consequence of the action of the Rb family of tumor suppressors perhaps due to their ability to repress multiple genes required for cell proliferation by promoting stable changes in their chromatin (Brehm & Kouzarides, 1999; Brehm et al., 1998; Nielsen et al., 2001).

It remains an open question how PML engages the Rb pathway to induce senescence. It has been reported that PML, like oncogenic Ras, can increase p16<sup>INK4a</sup> protein levels. However, high p16 levels in PML-expressing cells were only detected in cells already senescent (10 days after introduction of PML) (Ferbeyre et al., 2000) but not at earlier time points (Pearson et al., 2000 and our data not shown). Therefore, p16<sup>INK4a</sup> might have a late role in PML-induced senescence, perhaps in maintaining the arrest. It has been also reported that PML blocks the transport of specific mRNAs from the nucleus to the cytoplasm. One of these PML-regulated transcripts is the one coding for cyclin D. As a consequence, cells with high levels of PML do not express cyclin D (Cohen et al., 2001). This mechanism deserves validation in conditions in which PML induces senescence. One additional explanation, supported by our Rb localization results, is that the PML bodies provide a localized anti-CDK function that either protects Rb from phosphorylation or actively dephosphorylates Rb. Retroviral expression of CDK4 does not rescue PML-induced senescence (data not shown) and this would be consistent with either a defect in cyclin D mRNA export or the Rb localization model.

HPV is the single most important risk factor for developing cervical neoplasia (Franco et al., 2001). Our results suggest that a senescence response controlled by PML could be an important barrier to prevent the establishment of cervical carcinoma. Consistent with this idea, blocking the expression of E6 and E7 in cell lines derived from cervical carcinoma re-establishes the functions of p53 and Rb and induces senescence (Goodwin et al., 2000; Wells et al., 2000). Since PML is a critical regulator of senescence, studying the

status of PML could be useful to predict the outcome of HPV infections of the cervix or the prognosis of pre-malignant cervical lesions.

## Materials and methods

### Cells and retroviruses

Normal HDFs IMR90 cells (ATCC) were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Utah) and 1% penicillin G/streptomycin sulfate (GIBCO). Retroviral-mediated gene transfer was performed as previously described (Ferbeyre et al., 2000). Infected populations were prepared as follows: IMR90 cells were first infected with retroviruses expressing E6/E7, E6, E7, E7 $\Delta$ 21-24 or an empty vector (LXSN) and incubated in geneticin (Gibco, 400  $\mu$ g/ml) for 7 days, to eliminate uninfected cells. Infected cell populations were then re-infected with retroviruses expressing oncogenic *ras* (H-Ras-V12) (Serrano et al., 1997), *PML-IV* (Ferbeyre et al., 2000) or an empty control vector (pBabe) and selected in puromycin 2.5  $\mu$ g/ml for 3 days.

### Cell proliferation and senescence determination

Various assays were used to determine cell proliferation. For growth curves, we collected infected cell populations two days after selection and seeded  $2 \times 10^4$  cells in each well of a 12 wells plate (Costar, Corning Inc. NY). Cells were counted immediately after attachment (day 0) or on days 2, 4 and 6 after plating. Cell death was scored using the Trypan blue staining assay. BrdU and  $^3$ H-thymidine incorporation assays were performed as described (Ferbeyre et al., 2000).

Senescence was scored by determining the percentage of the population exhibiting a Senescence Associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) activity as described previously (Dimri et al., 1995).

## Protein expression

To prepare total cell extracts, cells were collected by trypsinization, washed with PBS, lysed in 100  $\mu$ l of SDS sample buffer (60 mM TrisHCl pH 6.8, 10 % glycerol, 2 % SDS and 5% 2-mercaptoethanol) and boiled for 5 minutes. For immunoblotting, 20  $\mu$ g of total cell protein were separated on SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). The following primary antibodies were used: anti-p53 (1:1000, Cell Signaling), anti-PhosphoSer15 p53 (1:1000, Cell Signaling), anti-p21 (C19, 1:250, Santa Cruz), anti-pRb (G3-245, 1:250, BD Pharmingen), anti-Mcm6 monoclonal antibody (1:5, kindly provided by Dr. H-J. Heidebrecht), anti-cyclin A (C19, 1:500, Santa Cruz), anti-PML (PG-M3, 1:200, Santa Cruz) and anti- $\alpha$ -tubulin (B-5-1-2, 1:5000, Sigma). Signals were revealed after incubation with anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies coupled to peroxidase (Amersham UK) by using enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, UK), or SuperSignal (West Pico, Pierce).

## Fluorescence microscopy

For fluorescence microscopy,  $2 \times 10^5$  cells were plated on coverslips positioned on 12 well plates (Costar, Corning Inc. NY). Twenty-four hours after plating, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature. Then, the cells were washed in PBS and permeabilized using ice-cold 0.2% triton X-100 in PBS/BSA solution for 5 minutes. Then, the cells were washed three times with PBS/BSA and incubated for one hour at room temperature with the following primary antibodies : anti-p53 mix (1801, 1:100 and 421, 1:100, Santa Cruz), anti-Rb (Rb1C1, kindly provided by G. Klein), anti-PML (PG-M3, 1:400, Santa Cruz) and anti-PML rabbit polyclonal (kindly provided by K.S. Chang, 1:100). The cells were washed and incubated for 1 hour with Oregon-Green and Texas-Red conjugated secondary antibody (1:1000, Molecular Probes, Eugene, OR). Finally, the cells were washed three times with PBS, incubated in 300 nM DAPI for 10



minutes and mounted on microscope slides. Images were obtained using a Nikon Eclipse TE2000-U microscope and the software MetaMorph (Universal Imaging Corp.). The figures were composed with Adobe Photoshop 6.0 and Canvas 8.

## **Acknowledgements**

We specially thank Dr. V. Bourdeau, L. Chatel-Chaix, Dr. L. DesGroseillers, Dr. E. Querido and Dr. M. Soengas for reviewing the manuscript. Dr. Karl Munger for useful suggestions. Dr. H-J. Heidebrecht for the anti-Mcm6 antibody and Drs. D. Galloway and P. Howley for plasmids and useful suggestions. Research supported by Grant 86239 from the Canadian Institute of Health and Research

## References

- Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P.G. & Dejean, A. (2002). *EMBO J.*, 21, 3358-69.
- Brehm, A. & Kouzarides, T. (1999). *Trends Biochem. Sci.*, 24, 142-5.
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J. & Kouzarides, T. (1998). *Nature*, 391, 597-601.
- Brookes, S., Rowe, J., Ruas, M., Llanos, S., Clark, P.A., Lomax, M., James, M.C., Vatcheva, R., Bates, S., Vousden, K.H., Parry, D., Gruis, N., Smit, N., Bergman, W. & Peters, G. (2002). *EMBO J.*, 21, 2936-45.
- Campisi, J. (2001). *Trends Cell Biol.*, 11, S27-31.
- Chang, B.D., Watanabe, K., Broude, E.V., Fang, J., Poole, J.C., Kalinichenko, T.V. & Roninson, I.B. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 4291-6.
- Cohen, N., Sharma, M., Kentsis, A., Perez, J.M., Strudwick, S. & Borden, K.L. (2001). *EMBO J.*, 20, 4547-59.
- Damalas, A., Kahan, S., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A. & Oren, M. (2001). *EMBO J.*, 20, 4912-22.
- Dannenberger, J.H., van Rossum, A., Schuijff, L. & te Riele, H. (2000). *Genes Dev.*, 14, 3051-64.
- Dimri, G.P., Itahana, K., Acosta, M. & Campisi, J. (2000). *Mol. Cell. Biol.*, 20, 273-85.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. & Campisi, J. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 9363-9367.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C. & Lowe, S.W. (2000). *Genes Dev.*, 14, 2015-2027.
- Franco, E.L., Duarte-Franco, E. & Ferenczy, A. (2001). *CMAJ*, 164, 1017-25.
- Garkavtsev, I. & Riabowol, K. (1997). *Mol. Cell. Biol.*, 17, 2014-9.

- Gollahon, L.S., Kraus, E., Wu, T.A., Yim, S.O., Strong, L.C., Shay, J.W. & Tainsky, M.A. (1998). *Oncogene*, 17, 709-17.
- Goodwin, E.C., Yang, E., Lee, C.J., Lee, H.W., DiMaio, D. & Hwang, E.S. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 10978-83.
- Greider, C.W. (1998). *Curr. Biol.*, 8, R178-181.
- Hahn, W.C., Dessain, S.K., Brooks, M.W., King, J.E., Elenbaas, B., Sabatini, D.M., DeCaprio, J.A. & Weinberg, R.A. (2002). *Mol. Cell. Biol.*, 22, 2111-23.
- Haq, R., Brenton, J.D., Takahashi, M., Finan, D., Finkielsztejn, A., Damaraju, S., Rottapel, R. & Zanke, B. (2002). *Cancer Res.*, 62, 5076-82.
- Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S. & Peters, G. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, 16, 859-67.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. & Greider, C.W. (1990). *Nature*, 345, 458-460.
- Hayflick, L. & Moorhead, P.S. (1961). *Exp. Cell Res.*, 25, 585-621.
- Heidebrecht, H.J., Buck, F., Endl, E., Kruse, M.L., Adam-Klages, S., Andersen, K., Frahm, S.O., Schulte, C., Wacker, H.H. & Parwaresch, R. (2001). *Lab. Invest*, 81, 1163-5.
- Helt, A.M. & Galloway, D.A. (2001). *J Virol.*, 75, 6737-47.
- Iwasa, H., Han, J. & Ishikawa, F. (2003). *Genes Cells*, 8, 131-44.
- Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.I., McDougall, J.K., Galloway, D.A. & Klingelhutz, A.J. (1998). *Nature*, 396, 84-8.
- Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U.M., Frye, R.A., Minucci, S., Pelicci, P.G. & Kouzarides, T. (2002). *EMBO J.*, 21, 2383-96.
- Lill, N.L., Grossman, S.R., Ginsberg, D., DeCaprio, J. & Livingston, D.M. (1997). *Nature*, 387, 823-7.
- Lin, A.W. & Lowe, S.W. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 5025-30.
- Macip, S., Igarashi, M., Fang, L., Chen, A., Pan, Z.Q., Lee, S.W. & Aaronson, S.A. (2002). *EMBO J.*, 21, 2180-8.
- Mantovani, F. & Banks, L. (2001). *Oncogene*, 20, 7874-87.
- Medcalf, A.S., Klein-Szanto, A.J. & Cristofalo, V.J. (1996). *Cancer Res*, 56, 4582-5.

- Melnick, A. & Licht, J.D. (1999). *Blood*, 93, 3167-215.
- Munger, K., Basile, J.R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S.L., Grace, M. & Zacny, V.L. (2001). *Oncogene*, 20, 7888-98.
- Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E. & Kouzarides, T. (2001). *Nature*, 412, 561-5.
- Palmero, I., McConnell, B., Parry, D., Brookes, S., Hara, E., Bates, S., Jat, P. & Peters, G. (1997). *Oncogene*, 15, 495-503.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P. & Pelicci, P.G. (2000). *Nature*, 406, 207-10.
- Peeper, D.S., Dannenberg, J.H., Douma, S., te Riele, H. & Bernards, R. (2001). *Nat Cell Biol*, 3, 198-203.
- Phelps, W.C., Yee, C.L., Munger, K. & Howley, P.M. (1988). *Cell*, 53, 539-47.
- Rheinwald, J.G., Hahn, W.C., Ramsey, M.R., Wu, J.Y., Guo, Z., Tsao, H., De Luca, M., Catricala, C. & O'Toole, K.M. (2002). *Mol. Cell. Biol.*, 22, 5157-72.
- Sage, J., Mulligan, G.J., Attardi, L.D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E. & Jacks, T. (2000). *Genes Dev.*, 14, 3037-50.
- Salomoni, P. & Pandolfi, P.P. (2002). *Cell*, 108, 165-70.
- Sedivy, J.M. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 9078-9081.
- Serrano, M. & Blasco, M.A. (2001). *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13, 748-53.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. & Lowe, S.W. (1997). *Cell*, 88, 593-602.
- Sherr, C.J. & DePinho, R.A. (2000). *Cell*, 102, 407-410.
- Smogorzewska, A. & de Lange, T. (2002). *EMBO J.*, 21, 4338-48.
- Stott, F.J., Bates, S., James, M.C., McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K.H. & Peters, G. (1998). *EMBO J.*, 17, 5001-14.

- Wang, W., Chen, J.X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J.J., Huang, S. & Sun, P. (2002). *Mol. Cell. Biol.*, 22, 3389-403.
- Wells, S.I., Francis, D.A., Karpova, A.Y., Dowhanick, J.J., Benson, J.D. & Howley, P.M. (2000). *EMBO J.*, 19, 5762-71.
- Westbrook, T.F., Nguyen, D.X., Thrash, B.R. & McCance, D.J. (2002). *Mol. Cell. Biol.*, 22, 7041-52.
- Xu, H.J., Zhou, Y., Ji, W., Perng, G.S., Kruzelock, R., Kong, C.T., Bast, R.C., Mills, G.B., Li, J. & Hu, S.X. (1997). *Oncogene*, 15, 2589-96.
- Young, J.I. & Smith, J.R. (2001). *J Biol Chem*, 276, 19610-6.

**Table I. E6/E7 reduce the number of PML bodies in cells expressing oncogenic *ras* or PML-IV.**

	PML bodies: number <sup>a</sup>	PML bodies: area <sup>b</sup>
LXSN/Vector	9±4	35±18
LXSN/Ras-V12	26±10	48±20
LXSN/PML-IV	26±11	117±36
E6/E7/Vector	8±4	20±10
E6/E7/RasV/12	14±10	34±24
E6/E7/PML-IV	13±8	36±28

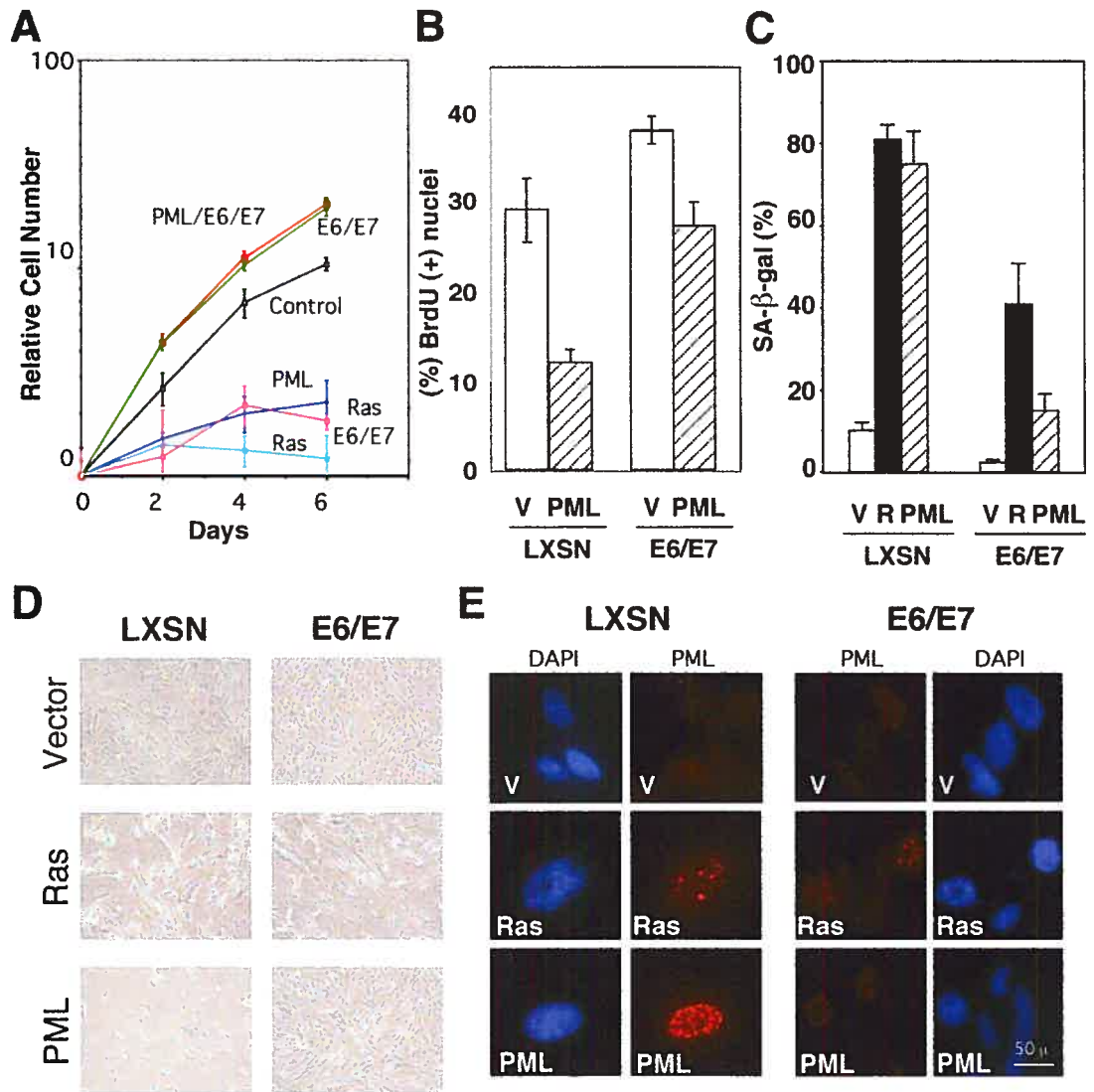
a) The number of PML bodies is the average of counting 100 cells for each cell population.

b) The area of the PML bodies was estimated using the morphometric analysis feature of the Metamorph software. We obtained the total quantity of pixels per nucleus, using an intensity threshold that lighted all PML bodies in a nucleus. This number was then divided by the amount of PML bodies present in the cell. Thereof, a relative size of the PML bodies can be estimated, expressed in pixels.

## Figures and legends

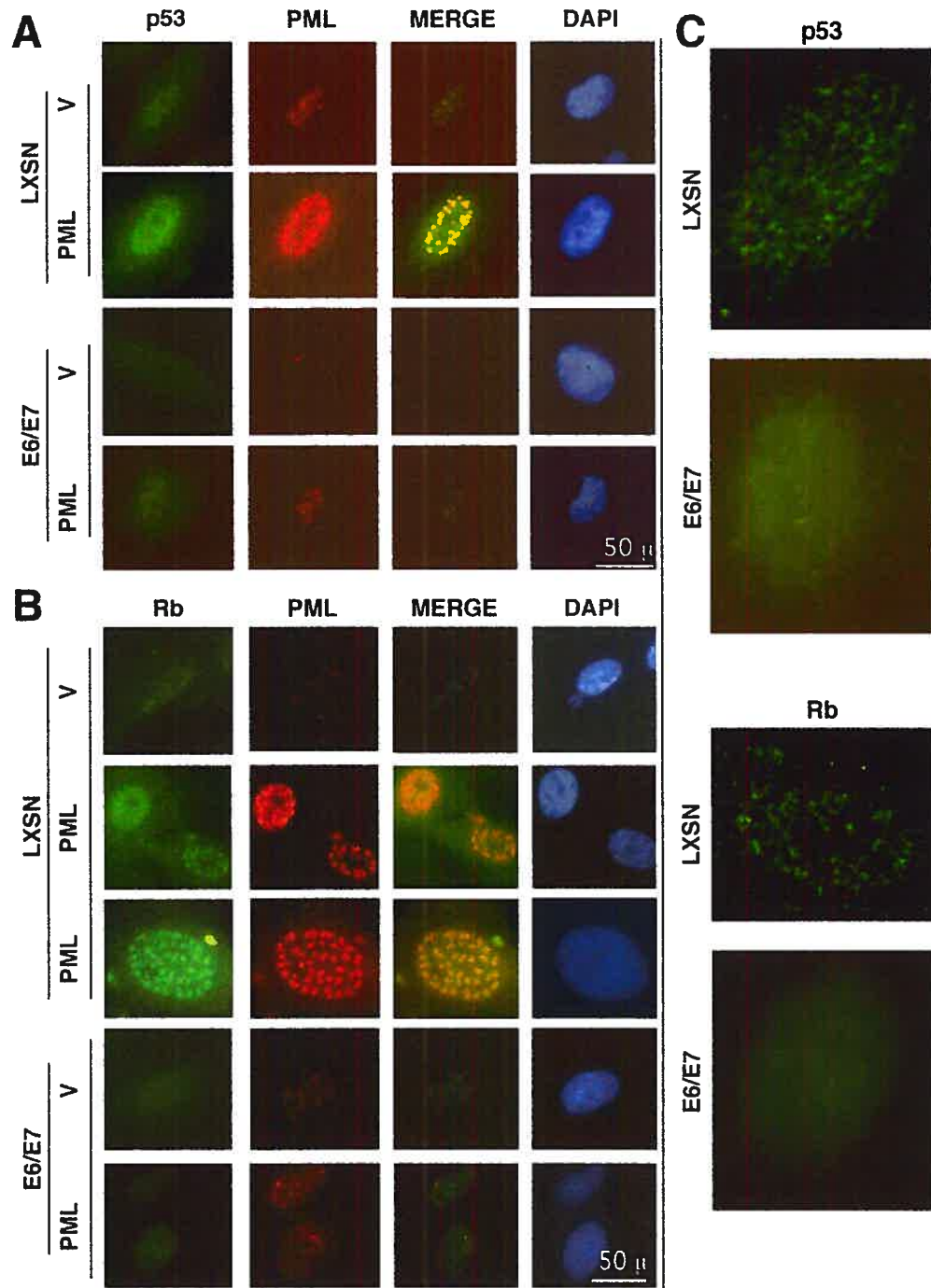
**Figure 1. Inhibition of PML-induced senescence by retroviral-mediated expression of HPV E6/E7.** A) Growth curves. IMR90 cells expressing PML, PML plus E6/E7, Ras-V12, Ras-V12 plus E6/E7, E6/E7 and only control vectors (Control) were plated as described in materials and methods. Cell numbers were scored immediately after attachment or after 2, 4 and 6 days in culture. B) BrdU incorporation assay. The same cell populations were plated at day 6 of the growth curve and grown in the presence of BrdU for 3 hours. The graphic shows the average of nuclei positive for BrdU incorporation after counting 200 cells in three separate experiments. C) and D) Senescence associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) staining. Cells were fixed and stained at a day corresponding to day 6 of the growth curve. The graphic in (C) shows the average of cells that stained positive for SA- $\beta$ -gal after counting 200 cells in three separated experiments. E) Immunodetection of PML bodies. Cells infected with the control vector LXSUN or its derivative containing E6/E7 were infected with either another control vector or its derivatives expressing Ras-V12 or PML. Cells containing these retroviruses were fixed at a day corresponding to day 6 of the growth curves. PML bodies were visualized by indirect immunofluorescence using the anti-PML antibody PG-M3. Nuclei were counterstained with DAPI.



**Figure 1**

**Figure 2. Effects of E6/E7 on p53 and Rb localization during PML-induced senescence.** Cells expressing the control vector LXS<sub>N</sub> or its derivative encoding for E6/E7 were infected with either another control vector or its derivative expressing PML. A) p53 protein and PML bodies were visualized by indirect immunofluorescence using the anti-PML antibody (PG-M3) and the anti-p53 antibodies (1801 and 421). B) Rb protein was visualized by indirect immunofluorescence using the anti-Rb antibody Rb1C1 and PML bodies were visualized as in (A). Two kinds of cells are shown to represent the population of cells expressing PML and the control vector LXS<sub>N</sub>. The middle panel represents the majority of the cells while the bottom panel is characteristic of around 16% of the cells (see text for comments). C) The frames corresponding to p53 staining in PML expressing cells without (second from the top in panel A) and with E6/E7 (fourth from the top in panel A) and to Rb staining in PML expressing cells without (cell to the right in second frame from the top in panel B) and with E6/E7 (fifth from the top in panel B) were enlarged and deconvoluted (Metamorph) to show the details of p53 and Rb localization.

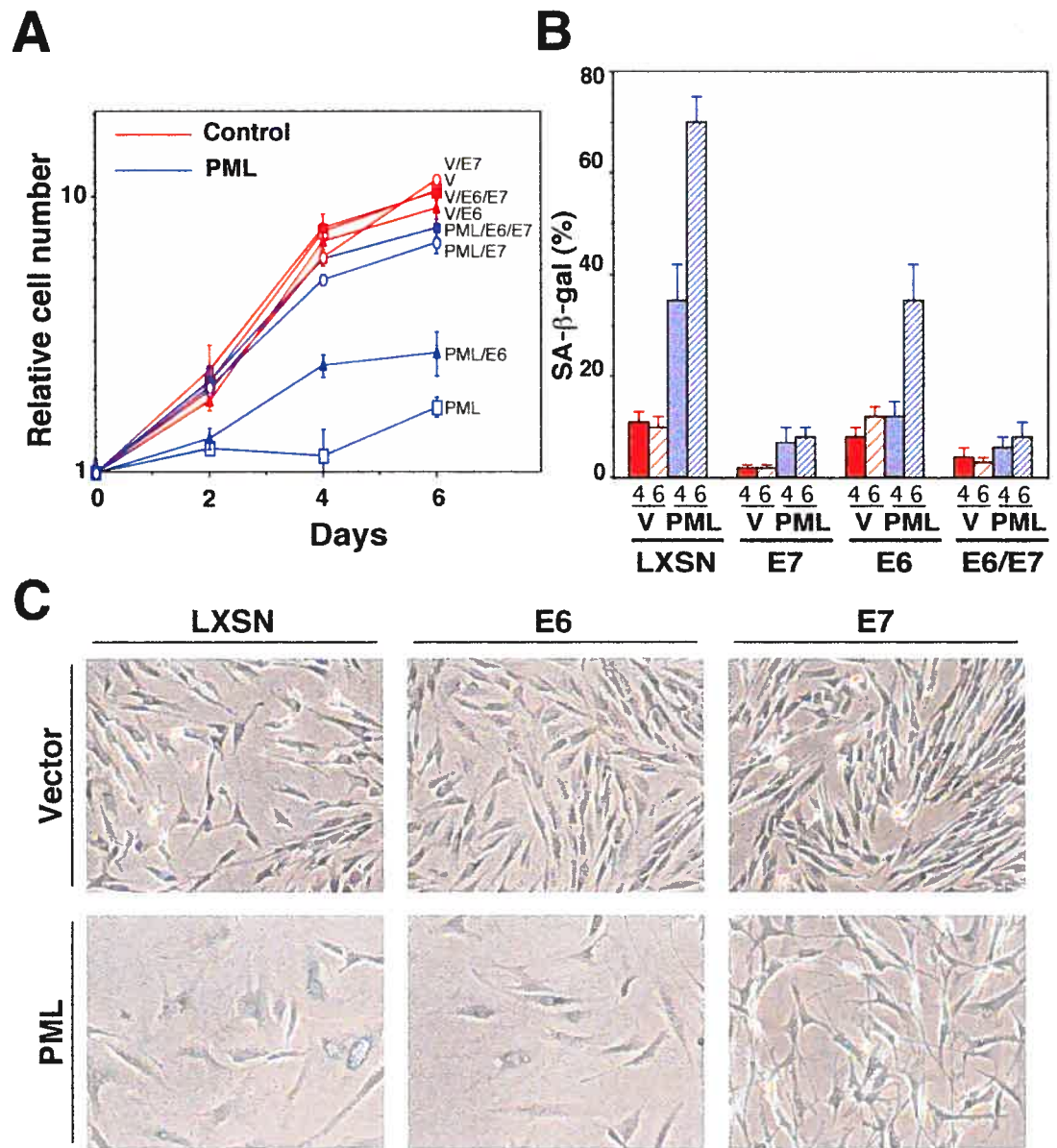
Figure 2



**Figure 3. Individual expression of E7 is sufficient to inhibit PML-induced senescence.**

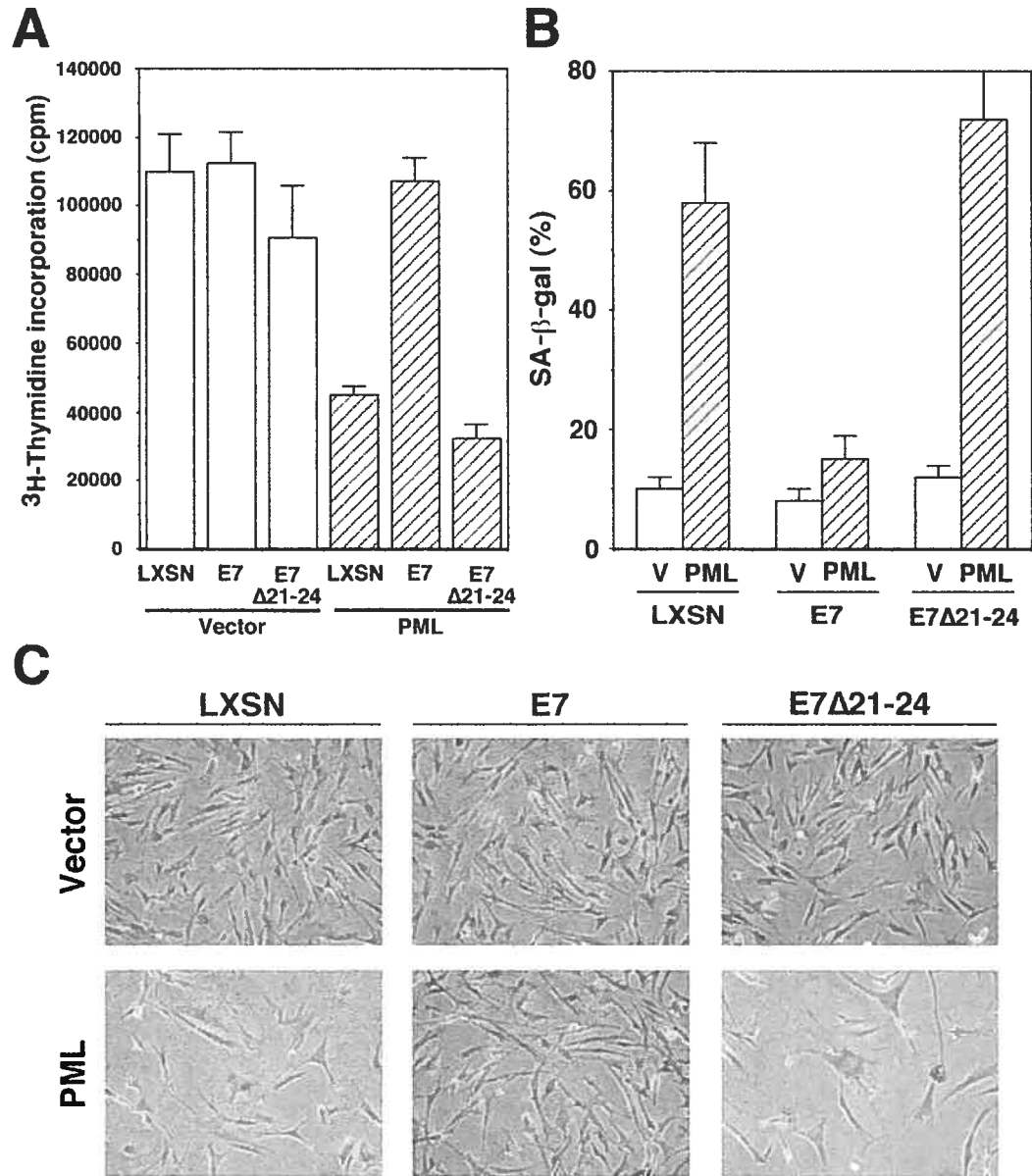
A) Growth curves. IMR90 cells expressing the control vector LXS<sub>N</sub> or its derivative expressing E6, E7 or E6/E7 were infected with a control vector pLPC (red) or its derivative expressing PML (blue). Infected populations were plated for growth curves two days after selection. Cell numbers were scored immediately after attachment or after 2, 4 and 6 days in culture. B) and C) Senescence associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) staining. The graphic in (B) shows the average of cells that stained positive for SA- $\beta$ -gal at days 4 and 6 scored by counting 200 cells in three separated experiments.

Figure 3



**Figure 4. The ability of E7 to bind Rb is required for the inhibition of PML-induced senescence.** A)  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation assay. IMR90 cells expressing the control vector LXS<sub>N</sub> or its derivative expressing E7 or E7 $\Delta$ 21-24 were infected with a control vector pLPC (open bars) or its derivative expressing PML (ruled bars).  $2 \times 10^4$  cells were plated in triplicate 6 days after selection, 24 hours later a pulse of 5  $\mu\text{Ci}$  of  $^3\text{H}$ -thymidine were added and the incorporation was scored after overnight incubation B) and C) Senescence associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) staining as in Figure 3.

**Figure 4**

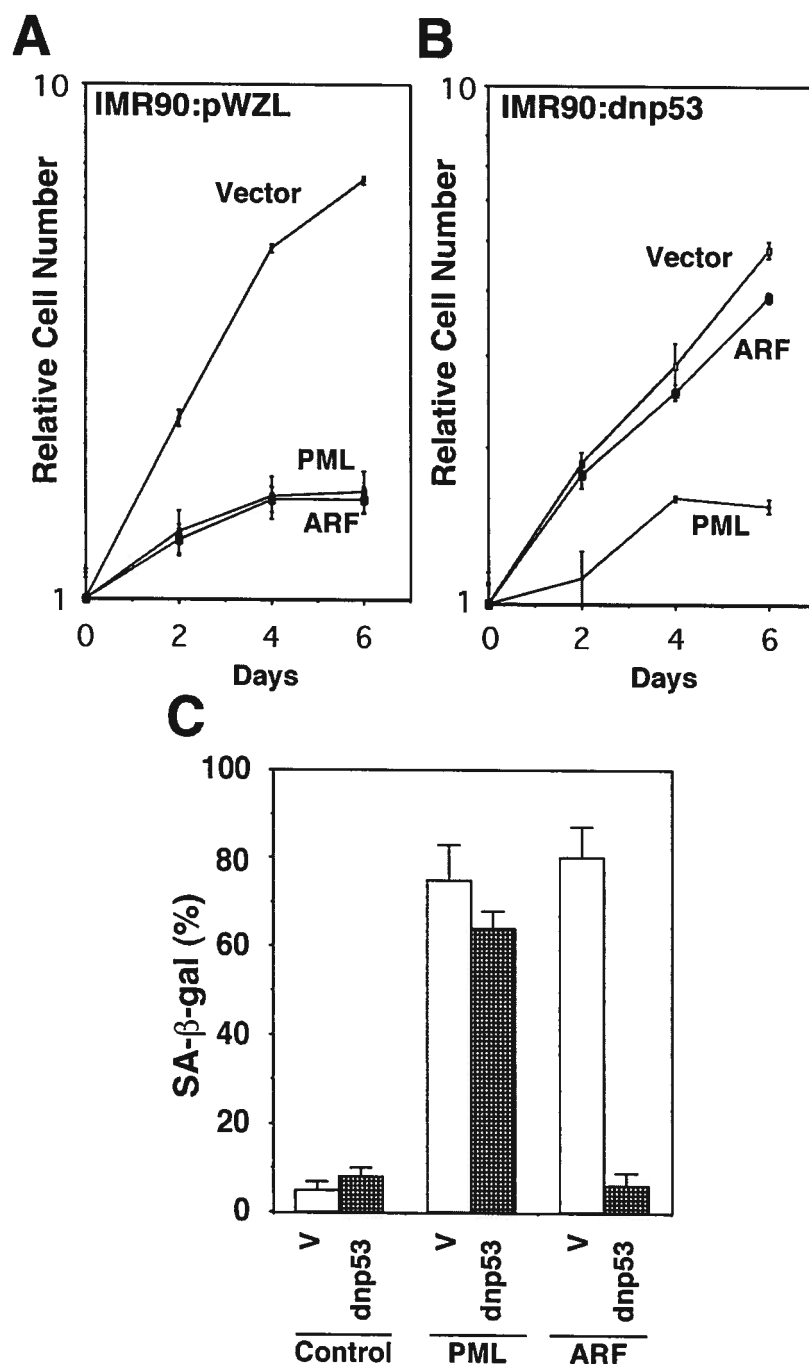


**Figure 5. Dominant negative p53 is not sufficient to inhibit PML-induced senescence.**

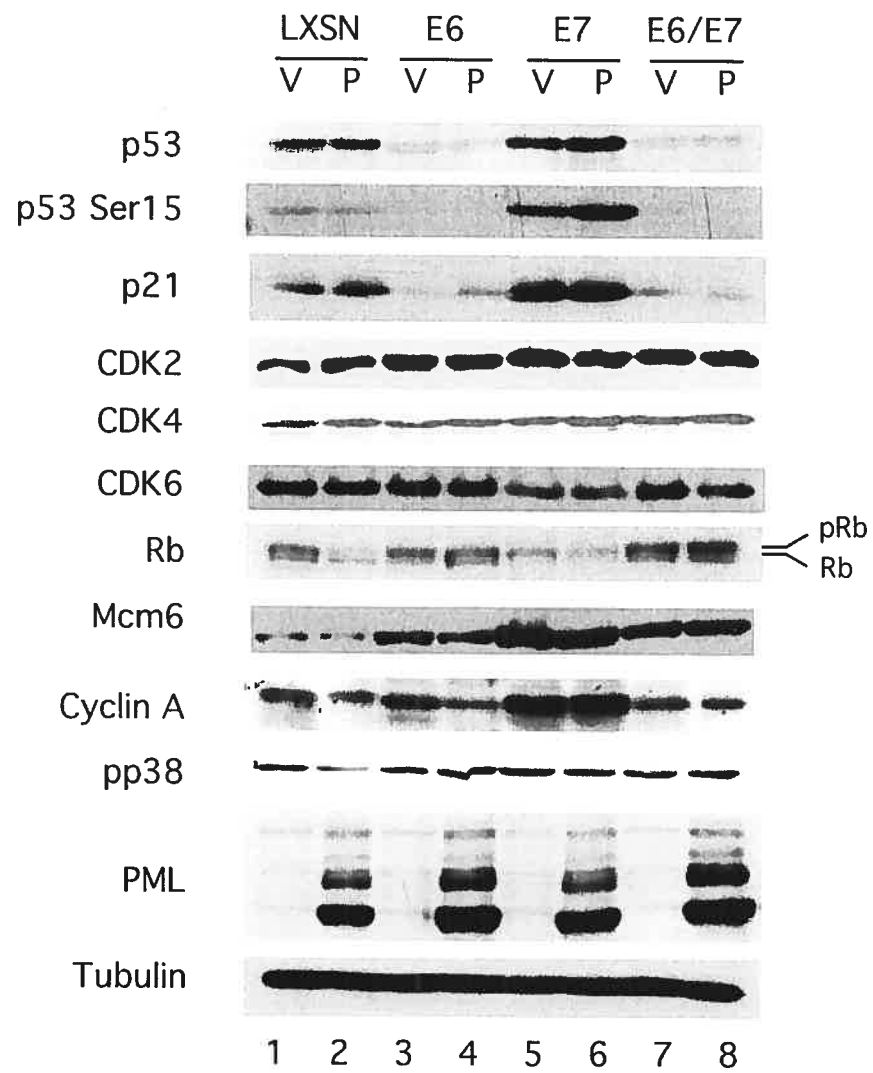
A) and B) Growth curves: IMR90 cells expressing pWZL vector (A) or its derivative coding for dominant negative p53 (dnp53) were infected with pLPC (Vector) pLPCPML (PML) or pLPCp14<sup>ARF</sup> (ARF), and plated as described in material and methods. Cell numbers were scored immediately after attachment (day 0) or after 2, 4 and 6 days in culture. The plot shows the cell number relative to the initial value for every cell population. C) Senescence associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal). Cells at a day corresponding to day 6 of the growth curve were fixed and stained as described in materials and methods. The graphic shows the average of cells that stained positive for SA- $\beta$ -gal after counting 200 cells in three separated experiments.



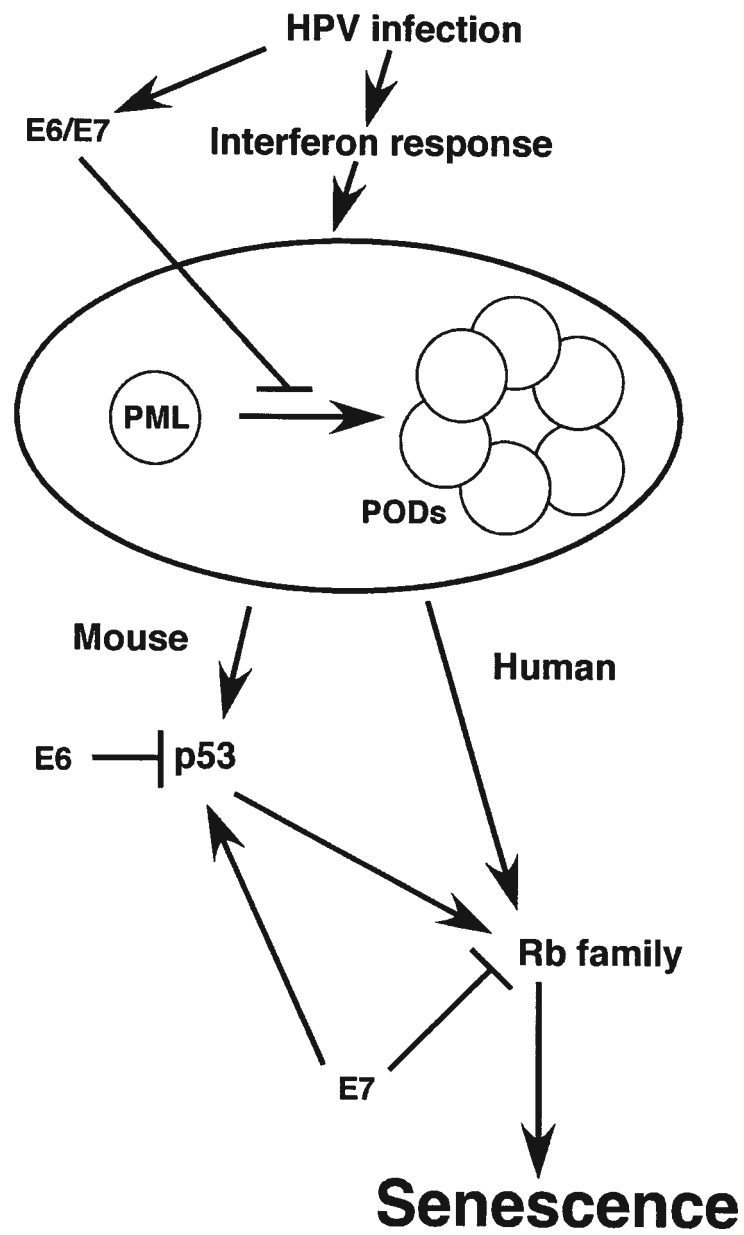
Figure 5



**Figure 6. Effects of E6 and E7 on cell cycle regulators in HDFs expressing PML or a control vector.** Cells expressing the control vector LXS<sub>N</sub> or its derivative expressing E6, E7 or E6/E7 were infected with either another control vector or its derivative expressing PML. Cell extracts were prepared from cells collected at a day corresponding to day 6 of the growth curves. Twenty  $\mu$ g of total proteins were used for SDS-PAGE and individual proteins were visualized after immunoblotting using specific antibodies.



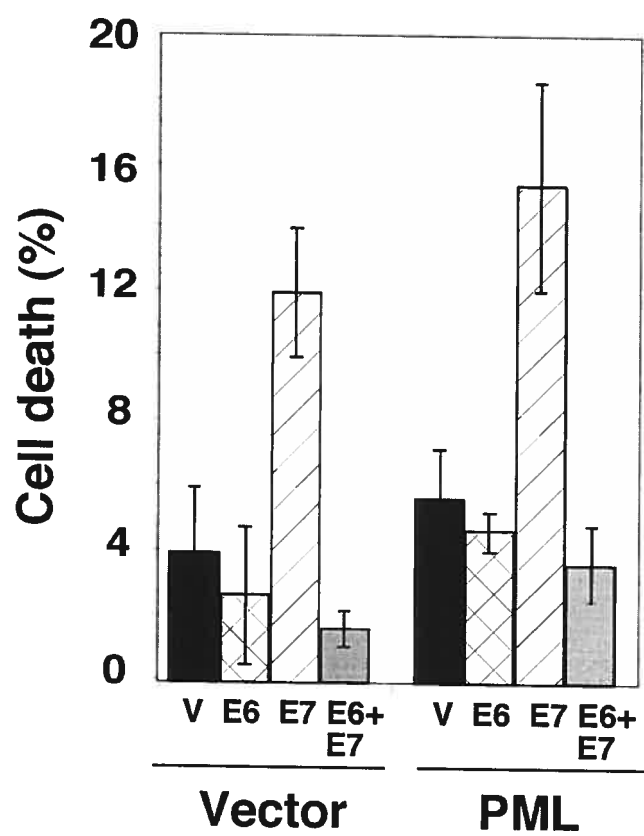
**Figure 7. PML-induced senescence in mouse and human normal fibroblasts.** In mouse cells PML induces senescence through p53 while the Rb family of proteins act downstream of p53 as suggested by Sage et al., 2000. In human fibroblasts, PML can directly engage the Rb pathway without a p53 requirement. HPV E7 blocks PML-induced senescence by blocking the Rb family of proteins but also triggers a p53 response. E6 is then required to counteract E7-induced p53 activity. E6 and E7 also cooperate to inhibit the formation of PML bodies. E6 and E7 could overcome an interferon-PML senescent response aimed to restrain proliferation of cells infected by viruses.

**Figure 7**

## **Supplementary figures and legends**

**Supplementary figure 1. E7 induces cell death in HDFs.** IMR90 cells expressing LXS<sub>N</sub>, E6, E7, or E6/E7 were infected with a PML expressing retrovirus or a control vector. Cell death was scored one day after selection using Trypan Blue staining.

Supplementary figure S1



**Supplementary figure 2. Effects of individual expression of E6 and E7 on PML bodies.**

Cells bearing the control vector LXS<sub>N</sub> or its derivative containing E6 or E7 were infected with either another control vector or its derivatives expressing PML. PML bodies were visualized by indirect immunofluorescence using the anti-PML antibody PG-M3. Nuclei were counterstained with DAPI.



## Supplementary figure S2

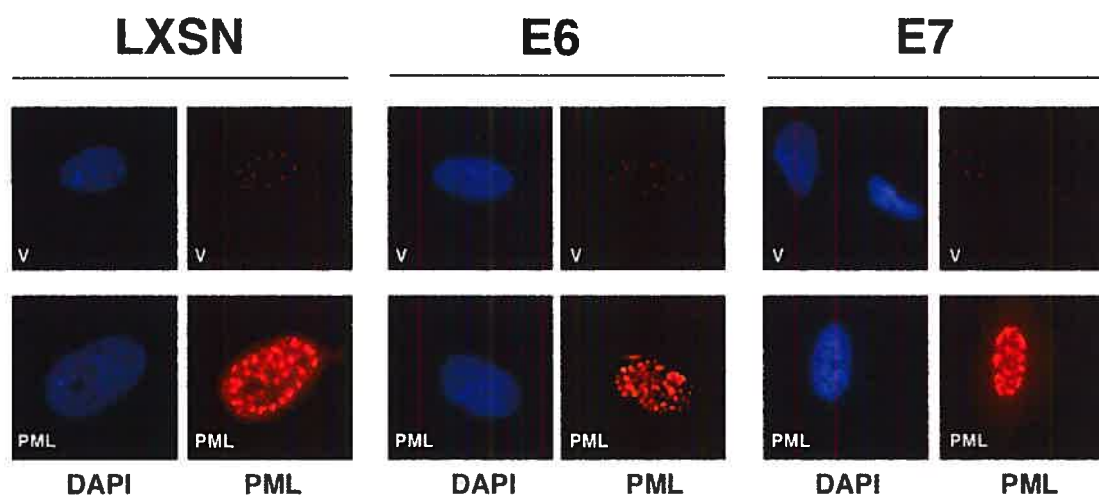


Table S1. E6 or E7 do not reduce the number of PML bodies when individually expressed.

	PML bodies: number	PML bodies: area
LXSN/Vector	<sup>a</sup> 9±5	<sup>b</sup> 29±10
LXSN/PML-IV	25±8	142±56
E6/Vector	7±4	20±6
E6/PML-IV	25±8	90±71
E7/Vector	7±3	31±12
E7/PML-IV	28±9	108±58

a and b) as in Table 1

c) We observed a considerable variation in the size of PML bodies in cells expressing E6. This is in large part due to the presence of two cell types in the populations of cells bearing E6 and PML-IV expressing retroviruses, one with small PML bodies and one with large PML bodies as seen in cells expressing PML alone (see supplementary material Fig. S2).

## **ARTICLE 2: Regulation of the Rb pathway by CDK4 downregulation during STAT5-induced senescence**

### **Mise en contexte**

Outre les membres de la voie Ras/Raf/Mek, peu d'oncogènes semblaient capables d'induire la sénescence. À la recherche de nouveaux oncogènes induisant la sénescence chez les cellules normales, nous avons étudié la réponse cellulaire générée suite à l'expression d'un mutant constitutivement activé de STAT5A.

La description d'un nouveau modèle de sénescence permet de comparer les mécanismes de déclenchement des voies de suppression tumorale. Cette étude suggère que plusieurs voies différentes permettent d'activer la voie de Rb lors de la sénescence.

Cet article a été soumis pour publication en juin 2007 à *Oncogene*.

Note: Contribution(s) des auteurs:

FAM: Infection de cellules primaires, essais de prolifération (BrdU), immunofluorescences, essais SA- $\beta$ -Gal, immunobuvardages et participation à l'écriture du manuscrit.

MFGL: Aide pour la culture cellulaire.

GF: Quantification des données d'immunofluorescence, supervision générale et écriture du manuscrit.

# **Regulation of the Rb pathway by CDK4 downregulation during STAT5-induced senescence**

Frédéric A. Mallette, Marie-France Gaumont-Leclerc, and Gerardo Ferbeyre.  
Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville,  
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

Keywords: STAT5, Rb, CDK4, Myc, senescence.

Running title: STAT5 and senescence.

Correspondence to:

Gerardo Ferbeyre, MD, PhD

Université de Montréal

Département de Biochimie, E-515

C.P. 6128, Succ. Centre-Ville

Montréal, Qc H3C 3J7

Phone 514 343-7571

Fax 514 343-2210

Email: [g.ferbeyre@umontreal.ca](mailto:g.ferbeyre@umontreal.ca)

Delivery

Département de Biochimie

Université de Montréal

Pavillon Roger-Gaudry, A-533

2900 Édouard-Montpetit

Montréal, Qc, CANADA H3T 1J4

## Abstract

The DNA damage response links multiple oncogenes to p53, but it is unknown if a common mechanism connects oncogenes to the Rb pathway. We found that constitutively active-STAT5A can induce a p53- and Rb-dependent cellular senescence response. However, ca-STAT5A did not induce p21 or p16<sup>INK4a</sup>, which are responsible for engaging the Rb pathway during the senescence response to oncogenic *ras*. Intriguingly, ca-STAT5A led to a downregulation of CDK4 both at the protein and the mRNA level and enforced expression of CDK4 blocked STAT5A-induced senescence in cells where p53 was inactivated as well. The downregulation of CDK4 was associated to a dramatic decrease in Myc levels and Myc target genes and a partial localization of Myc in PML bodies. Introduction of Myc or an allele of Myc resistant to proteasome dependent degradation bypassed STAT5A-induced senescence and increased CDK4 levels in cells where p53 was inactivated. These results uncover a novel mechanism to engage the Rb pathway in oncogene-induced senescence.

## Introduction

The retinoblastoma (Rb) family controls cell proliferation by providing a barrier for cell cycle transitions (Classon and Harlow, 2002; Cobrinik, 2005). In molecular terms, this barrier consists of a repression of the E2F family of transcription factors, which control the synthesis of genes required for cell cycle progression (Muller *et al.*, 2001). The Rb family mediated control is important for regulating cell proliferation but is also implicated in preventing tumors (Classon and Harlow, 2002). During normal cell cycle, Rb is active when hypophosphorylated. Growth factors, activate the CDK-cyclin complexes that phosphorylate Rb, inhibiting its binding to E2F factors (Cobrinik, 2005). Gain of function mutations in genes that stimulate cell cycle progression can potentially disable the Rb barrier. Hence, for efficient tumor suppression, normal cells must avoid Rb inactivation by oncogenes. Studies on the senescent cell cycle arrest in response to oncogenic *ras* provided a general model of Rb activation by oncogenes in normal cells. Aberrant *ras* activity, induces the expression of CDK inhibitors of the INK4 family such as p15<sup>INK4b</sup> (Malumbres *et al.*, 2000) and p16<sup>INK4a</sup> (Serrano *et al.*, 1997). As a consequence, Rb accumulates in its active, hypophosphorylated form during Ras-induced senescence. This pathway is critical for Ras-induced senescence because disabling either p16<sup>INK4a</sup> or the Rb family inhibits the process (Huot *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 1997).

The senescence tumor suppressor mechanism is not an exclusive response to oncogenic *ras*. Other oncogenes can equally induce the process (Bartkova *et al.*, 2006; Dimri *et al.*, 2000; Mallette *et al.*, 2007), although the role of the Rb pathway has not been fully investigated in every case. In addition, it is not clear whether the INK4 proteins are universal mediators of Rb activation in response to oncogenes or whether other mechanisms can engage Rb to regulate senescence. To answer this question we have developed a model of oncogene-induced senescence in normal human fibroblasts expressing a constitutive active allele of the STAT5 oncogene (Mallette *et al.*, 2007).

STAT5A and B (Signal Transducers and Activators of Transcription 5A and B) were identified as two highly similar transcription factors that mediate the response to prolactin in the mammary gland (Wakao *et al.*, 1994). They are also required for cell cycle progression in peripheral T cells (Moriggl *et al.*, 1999) and may control genes regulating the cell cycle, growth, death and differentiation in several tissues in response to hormones and cytokines (Bowman *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2006). STAT5 transcription factors are transiently activated by tyrosine phosphorylation in response to a variety of cytokines and hormones (Gouilleux *et al.*, 1995). Constitutive activation of STAT5 has been observed in several human malignancies (Bowman *et al.*, 2000). The oncogenic activities of STAT5 have been linked to its ability to stimulate cell proliferation (Friedrichsen *et al.*, 2003; Martino *et al.*, 2001; Onishi *et al.*, 1998) and block apoptosis in tumor cells (Nieborowska-Skorska *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2002; Sillaber *et al.*, 2000). In some settings, STAT5 activation can cooperate with oncogenic *ras* for transformation (Hoover *et al.*, 2001; Sonoyama *et al.*, 2002) indicating that they induce different oncogenic pathways.

We previously reported that STAT5A1\*6, a constitutively activated STAT5A, (ca-STAT5A) induced a p53- and Rb-dependent cellular senescence program (Mallette *et al.*, 2007). We now show that ca-STAT5A engages the Rb pathway by downregulating CDK4, instead of the p16<sup>INK4a</sup>-mediated mechanism described in RasV12-induced senescence. We also found that the ca-STAT5A allele blocks Myc activity and downregulates Myc levels providing a mechanism for the decrease in CDK4. This downregulation of CDK4 was necessary for senescence because enforced expression of CDK4 or its activator Myc contributed to bypass STAT5A-induced senescence.

## Results

### Constitutively activated STAT5 induces senescence in human cells

We reported that the DNA damage response (DDR) was required to induce p53 during STAT5-induced senescence (Mallette *et al.*, 2007). However, the mechanism of activation of the Rb pathway in response to ca-STAT5A remained unknown. To investigate how STAT5A engages the Rb pathway, we used a retrovirus that directs the expression of ca-STAT5A in human diploid fibroblasts (HDFs). We used as a control a virus expressing RasV12, which is known to activate Rb by inducing p16<sup>INK4a</sup>. RasV12 or ca-STAT5A-expressing HDFs proliferated normally during the first four days after retroviral infection, indicating that the immediate effect of the introduction of these oncogenes does not inhibit cell growth. However, both RasV12 and ca-STAT5A-expressing cells dramatically decreased their DNA synthesis eight days after retroviral infection (six days post-selection) (Figure 1A) and remained in a non-dividing state for at least 20 days. Cells expressing ca-STAT5A arrested their proliferation with a prominent G1 DNA content (Figure 1B) and displayed morphology of flat cells that stained positive for (SA- $\beta$ -Gal) (figure 1C). This senescent response to STAT5A was also documented in BJ cells, another strain of normal human fibroblasts (Supplementary figure 1) and in primary mammary epithelial cells (Figure 1D). Hence, STAT5A-induced senescence is not restricted to IMR90 fibroblasts.

Next we used a wild type allele of STAT5A to investigate if the ability of inducing senescence correlated with oncogenic activity. We found that STAT5A-induced senescence was only observed with the oncogenic allele STAT5A1\*6 and not with wild type STAT5A (Supplementary figure 2). Also, ca-STAT5B (also known as STAT5B1\*6), which had the same activating mutations as STAT5A1\*6, but was not constitutively phosphorylated to the same extent (Figure 1E), was not able to induce senescence in a significant proportion of the cells (data not shown). Importantly, the levels of ca-STAT5A attained with our

retroviral vector were comparable to endogenous STAT5 levels in fibroblasts and were much lower than the amounts found in the erythroleukemia line K562 (Figure 1E). In addition, the levels of phospho-STAT5A displayed by ca-STAT5A infected fibroblasts were comparable to those found in K562 cells (Figure 1E). We concluded that ca-STAT5A induced senescence in normal cells when activated to the same extent as it is found in human cancers, providing a new model to investigate the mechanisms of Rb activation during oncogene-induced senescence.

### **Constitutively active STAT5A induces the downregulation of CDK4 and activation of the Rb pathway in human cells**

The activation of the Rb pathway in response to oncogenes in normal cells is known to involve induction of CDK inhibitors, such as p21, p16<sup>INK4a</sup> or p15<sup>INK4b</sup> (reviewed in Lowe *et al.*, 2004). These molecules block the activity of the CDKs, which are known to catalyze Rb inactivation by phosphorylation (Sherr, 1994). Therefore, a similar Rb activating effect could be attained if CDK activity is inhibited by other means. To better characterize the mechanism of Rb activation during ca-STAT5A-induced senescence, we measured the levels of the upstream regulators and downstream effectors of the Rb pathway (Figure 2A). To begin with, senescence induced by ca-STAT5A was characterized by Rb hypophosphorylation, downregulation of the E2F-dependent genes Cyclin A and Mcm6 and up-regulation of ezrin. The latter was shown to be induced by Rb, mediating the characteristic flat morphology of senescent cells (Yang and Hinds, 2003). Intriguingly, and in contrast to Ras-induced senescence, ca-STAT5A did not induce p16<sup>INK4a</sup> or p21 but lead to a significant downregulation of CDK4. CDK4 downregulation was also observed at the mRNA level (Figure 2B). In consequence, oncogenic STAT5A engages the Rb pathway by a mechanism different from the one reported during Ras-induced senescence. To investigate this mechanism, we next conducted a genetic analysis of the factors that can rescue STAT5-induced senescence.



## **Genetic analysis of the Rb pathway during STAT5-induced senescence**

In human cells, oncogene-induced senescence is a robust process and can occur in cells where p53 or Rb have been disabled. In other words, to bypass senescence it is necessary to inactivate both the p53 and the Rb pathway. To investigate the contribution of the Rb pathway during STAT5-induced senescence, we prepared IMR90 cell populations expressing, alone or in different combinations, the viral oncoproteins E1A, E6 and E7 and a dominant negative allele of p53 (dnp53). Disabling p53 activity with dnp53 or E6 did not block the senescence response to ca-STAT5A or RasV12. Also, disabling the Rb pathway with E7 did not block ca-STAT5A- or RasV12-induced senescence (Figure 3). Only the simultaneous inhibition of both pathways by co-expression of E6 and E7 or dnp53 and E7 or E1A, blocked STAT5A-induced senescence as revealed by the SA- $\beta$ -Gal marker (Figure 3) or PML bodies induction (Supplementary figure 3). In fact, disabling Rb and p53 allowed the propagation of ca-STAT5A-expressing cells for several passages without any sign of proliferation arrest or senescence morphology. Similar results were previously reported for the senescence response to RasV12 in human cells (Ferbeyre et al., 2000; Serrano et al., 1997).

Next we investigated whether CDK4 levels were limiting in cells that senesce after expression of ca-STAT5A. To do the experiment, we first prepared IMR90 cells expressing E6 to inactivate the p53 pathway. In these cells, the expression of CDK4 completely bypassed STAT5A-induced senescence (Figure 4). These results suggest that CDK4 expression is the target of a tumor suppression mechanism that prevents the oncogenic activity of STAT5A in normal cells.

## **Mechanism of CDK4 downregulation during STAT5-induced senescence**

The decrease in CDK4 protein and mRNA levels during STAT5-induced senescence suggest either a decrease in CDK4 gene expression or an increase in mRNA turnover. We first investigated the effects of STAT5A on the CDK4 promoter and its main

known regulator c-Myc (Hermeking et al., 2000). This promoter contains Myc binding sites and as reported before (Hermeking et al., 2000) it is stimulated by Myc in transient transfection assays (data not shown). Transfection of STAT5A together with Myc and the CDK4 promoter blocked Myc activity (Figure 5). However, ca-STAT5A did not affect the ability of p53 to stimulate the p21 and the Mdm2 promoters (Figure 5). Hence, ca-STAT5A can specifically inhibit Myc activity.

Next we investigated Myc levels and activity in the context of ca-STAT5A-induced senescence. STAT5-induced senescence caused a dramatic reduction of Myc protein levels (Figure 6A). This degradation was proteasome dependent because the proteasome inhibitor MG-132 rescued Myc levels (Figure 6B). This suggests that ca-STAT5A engages a program of Myc inhibition through proteasome degradation. To confirm this hypothesis we measured other Myc target genes during STAT5-induced senescence. We found a downregulation of classic Myc targets such as Cdc7 and Cdc25C (Figure 6C) (Lawlor et al., 2006). The magnitude of the decrease was similar to the decrease of the E2F target thymidine kinase 1 (TK1). Taken together, the data reveal a downregulation of the Myc pathway in response to oncogenic STAT5A.

Next we looked for STAT5-target genes that could influence Myc degradation. We first focused on PML, which is known to be regulated by STAT transcription factors and contain STAT5-binding sites in its promoter (Lavau et al., 1995). PML can interact with Myc and induce its degradation (Buschbeck et al., 2007; Cairo et al., 2005; Smith et al., 2004). As expected, we found that ca-STAT5A induced the formation of PML bodies when expressed in normal human fibroblasts (Figure 6D). Also, using confocal microscopy we revealed that a fraction of these PML bodies colocalized with Myc during STAT5-induced senescence (Figure 6E). Although the extent of colocalization was rather moderate, it was similar to previous reports of Myc localization to PML bodies (Cairo et al., 2005; Smith et al., 2004). Together the data is consistent with a model of dynamic localization of Myc to PML bodies where Myc may undergo degradation or a modification that ultimately targets it to the proteasome.

### **Myc cooperates with E6 to bypass STAT5-induced senescence**

To investigate whether the downregulation of Myc by ca-STAT5A is causal to the senescence response, we prepared HDFs where the p53 pathway was inactivated using E6. In this way, we can study the role of the Myc/CDK4/Rb pathway in isolation. Introduction of ca-STAT5A in E6-expressing HDFs induced senescence as described above. However, coexpression of ca-STAT5A with Myc and E6 dramatically reduced the numbers of senescent cells (Figure 7A). An allele of Myc with increased stability due to the mutation T58A (Sears *et al.*, 2000) was even more potent in blocking STAT5A-induced senescence. Both Myc and MycT58A were able to rescue CDK4 expression in STAT5A-expressing cells (Figure 7B). These results indicate that Myc inactivates Rb via regulation of CDK4 expression in the context of cells expressing oncogenic STAT5A (Figure 7C). This mechanism may contribute to the powerful oncogenic effects of Myc.

## Discussion

We report here that ca-STAT5A activated the Rb pathway without measurable induction of CDK inhibitors such as p16<sup>INK4a</sup> or p21, as reported in cells expressing RasV12 (Huot *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 1997). Rather, STAT5A-expressing cells displayed a downregulation of CDK4. This downregulation was causal to the senescence process because STAT5A-induced senescence was rescued by enforced expression of CDK4 or the CDK4 activator Myc in cells where p53 was inactivated by E6.

The mechanism of CDK4 downregulation during STAT5-induced senescence seems to operate, at least in part, at the mRNA level and may involve the ability of STAT5 to downregulate Myc. In agreement with our model, ablation of one c-myc allele in primary fibroblasts using homologous recombination induced cellular senescence. However, in that case, low levels of Myc failed to activate Bmi1, a p16<sup>INK4</sup> repressor (Guney *et al.*, 2006). Perhaps this particular effect of Myc inhibition does not occur in the context of the expression of oncogenic STAT5.

Our work links the regulation of Myc stability to the senescence program, placing Myc as a critical regulator of the Rb pathway. In agreement, enforced expression of Myc in human primary prostate epithelial cells inactivated the Rb pathway leading to cellular immortalization (Gil *et al.*, 2005). Genetically, downregulation of Myc during STAT5-induced senescence is equivalent to the role proposed for p16<sup>INK4a</sup> during Ras-induced senescence. Our data also implies that factors regulating Myc stability in response to oncogenes play important tumor suppressor roles. One of those factors is the PML protein, which has been shown to regulate Myc degradation (Buschbeck *et al.*, 2007; Cairo *et al.*, 2005) and can be directly regulated by STAT5A or p53 (de Stanchina *et al.*, 2004; Lavau *et al.*, 1995). Although PML is induced by oncogenic *ras* via p53 (de Stanchina *et al.*, 2004; Ferbeyre *et al.*, 2000), we did not find a dramatic CDK4 or Myc downregulation during Ras-induced senescence. This may indicate that other STAT5 regulated genes play a critical role in Myc degradation.

One intriguing finding in this study is that expression of CDK4 or Myc alone could not rescue cells from STAT5A-induced senescence. This is because oncogenes induce p53 via DNA damage signaling (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Mallette et al., 2007). Therefore, activation of p53 in cells with a disabled Rb pathway is sufficient to induce senescence (Mallette et al., 2007; Serrano et al., 1997). On the other hand, disruption of the p53 pathway did not prevent senescence in response to oncogenic ras or ca-STAT5A, indicating that the Rb pathway is also sufficient to induce senescence. In agreement, it has been shown that Cdk4 disruption leads to a p53 independent senescence in mouse primary fibroblasts (Zou et al., 2002). Hence, both Rb or p53 tumor suppressors can activate the program leading to cellular senescence and disruption of both pathways is required to allow cell proliferation in response to activated oncogenes in primary human cells. These independent connections of the Rb and p53 pathway with oncogenic signals ensure robustness in tumor suppression pathways, preventing cell transformation when p53 or Rb is accidentally inactivated (Figure 7C). However, in wild type cells, both pathways act in concert showing multiple cross connections. For example the p53 target p21 can activate Rb via inhibition of CDKs (Harper et al., 1995). Also, PML can activate both the p53 and the Rb pathway (Ferbeyre et al., 2000; Mallette et al., 2004; Pearson et al., 2000).

Our work has important implications for tumors that are characterized by a constitutive activation of STAT5. These include many frequent neoplasias such as several leukemias (Bowman *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2005; Sillaber *et al.*, 2000), Hodgkin lymphoma (Weniger *et al.*, 2006), breast cancer (Nevalainen *et al.*, 2004; Yamashita and Iwase, 2002), prostate cancer (Li *et al.*, 2004) and head and neck cancer (Xi *et al.*, 2003). We anticipate that these tumors must have genetic or epigenetic changes inactivating the signaling pathways from STAT5A to senescence including overexpression of Myc and loss of p53 target genes associated to senescence.

## **Materials and Methods**

### **Cells and Retroviruses**

Normal human diploid fibroblasts (HDFs) BJ (Dr. S. Lowe) and IMR90 (ATCC) were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Utah) and 1% penicillin G/streptomycin sulfate (GIBCO). Primary human mammary epithelial cells (HMEC) were cultured in MEGM (Clonetics) containing 10 ng/mL hEGF, 5 µg/mL insulin, 0.5 µg/mL hydrocortisone, 50 µg/mL gentamicin, 50 ng/mL amphotericin-B and 52 µg/mL bovine pituitary extract at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.

Retroviral vectors are described in supplementary methods. Retroviral-mediated gene transfer, cell proliferation analysis (growth curves, BrdU and <sup>3</sup>H-thymidine incorporation assays), cell cycle analysis and senescence assays were done as described (Ferbeyre et al., 2000; Mallette et al., 2007).

### **Protein expression analysis**

To prepare total cellular protein, cells were collected by trypsinization, washed with PBS, lysed in 100 µL of SDS sample buffer (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % glycerol, 2 % SDS and 5% 2-mercaptoethanol) and boiled for 5 min. For Western blots, 20 µg of total cell protein were separated on SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). Primary antibodies are described in supplementary methods. Signals were revealed after incubation with anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies coupled to peroxidase (Amersham) by using enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham) or Lumi-Light<sup>PLUS</sup> (Roche).

### Luciferase assays

For luciferase assays, H1299 cells were seeded at  $2,5 \times 10^5$  cells per well in 6 wells plates. Cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 2  $\mu$ g of the firefly luciferase reporter plasmid under the control of the CDK4 (C. V. Dang, Johns Hopkins USA), p21 or MDM2 promoter, 0,5  $\mu$ g of the *Renilla* luciferase reporter plasmid under the control of the  $\beta$ -globin promoter, 250 ng of Myc or p53 expressing plasmids and increasing amounts (0 $\mu$ g, 0,1 $\mu$ g or 1 $\mu$ g) of pBabeSTAT5A1\*6 (ca-STAT5A). The total quantity of plasmid was kept constant by adding the empty vector pBabe. Cells were harvested 24 hours after transfection and processed for Dual-Luciferase assay (Promega) according to manufacturer's instructions.

### RNA analysis

For real time RT-PCR or semi-quantitative RT-PCR, 2-5 $\mu$ g of total RNA were reverse transcribed with RevertAid™ H Minus First Strand Synthesis kit (Fermentas) using oligo dT primers and the resulting first strand cDNA was used as template for PCR. Specific primers are described in supplementary methods.

### Fluorescence microscopy

For fluorescence microscopy,  $2 \times 10^4$  control IMR90 cells expressing the indicated retroviral vectors were plated on coverslips placed on 6 wells plates (Costar, Corning Inc. NY). Twenty-four hours after plating, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Then the cells were washed in PBS and permeabilized using ice-cold 0.2% triton X-100 in PBS-3%BSA solution for 5 min. Then the cells were washed three times with PBS/BSA and incubated for one hour at room temperature with the primary antibodies. Next, the cells were washed with PBS/BSA and incubated for 1 hour with Alexa 488 and or Alexa 574 secondary antibody (1:1000, Molecular Probes). Finally, the cells were washed three times with PBS, incubated in 300 nM DAPI for 10 min and

mounted on microscope slides with VectaShield (Vector Labs, USA). Indirect immunofluorescence images were obtained at room temperature using a Nikon Eclipse TE-2000U microscope and the MetaMorph software (Universal Imaging Corp.) Confocal images were obtained with the Olympus FluoView 300 confocal microscope and the software FluoView. All images were then processed using Adobe Photoshop 6.0.



## **Acknowledgements**

We thank V. Bourdeau, L. Chatel-Chaix, L. Doucet, S. Goumard, B. Mao, A. Montmarquette, E. Querido, M. Soengas and members of the Ferbeyre laboratory for comments and technical assistance; C.V. Dang, D. Galloway, T. Kitamura, S. Lowe and S. Mader for cells and plasmids. This work was supported by CIHR to G.F. and a fellowship from Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) to F.A.M. GF is a chercheur junior II FRSQ.

**Abbreviation list**

DDR, DNA damage response; ca-STAT5A, constitutively active STAT5A; SA- $\beta$ -Gal, senescence associated  $\beta$ -galactosidase;

## References

- Bartkova, J., N. Rezaei, M. Lontos, P. Karakaidos, D. Kleitsas, N. Issaeva, L.V. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V.C. Zoumpourlis, M. Takaoka, H. Nakagawa, F. Tort, K. Fugger, F. Johansson, M. Sehested, C.L. Andersen, L. Dyrskjot, T. Orntoft, J. Lukas, C. Kittas, T. Helleday, T.D. Halazonetis, J. Bartek, and V.G. Gorgoulis. 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 444:633-7.
- Bowman, T., R. Garcia, J. Turkson, and R. Jove. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene*. 19:2474-88.
- Buschbeck, M., I. Uribesalgo, A. Ledl, A. Gutierrez, S. Minucci, S. Muller, and L. Di Croce. 2007. PML4 induces differentiation by Myc destabilization. *Oncogene*. 26:3415-22.
- Cairo, S., F. De Falco, M. Pizzo, P. Salomoni, P.P. Pandolfi, and G. Meroni. 2005. PML interacts with Myc, and Myc target gene expression is altered in PML-null fibroblasts. *Oncogene*. 24:2195-203.
- Classon, M., and E. Harlow. 2002. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2:910-7.
- Cobrinik, D. 2005. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*. 24:2796-809.
- de Stanchina, E., E. Querido, M. Narita, R.V. Davuluri, P.P. Pandolfi, G. Ferbeyre, and S.W. Lowe. 2004. PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell*. 13:523-35.
- Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P.G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P.G. Pelicci, and F. d'Adda di Fagagna. 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 444:638-42.

- Dimri, G.P., K. Itahana, M. Acosta, and J. Campisi. 2000. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol. Cell. Biol.* 20:273-85.
- Ferbeyre, G., E. de Stanchina, E. Querido, N. Baptiste, C. Prives, and S.W. Lowe. 2000. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev.* 14:2015-2027.
- Friedrichsen, B.N., H.E. Richter, J.A. Hansen, C.J. Rhodes, J.H. Nielsen, N. Billestrup, and A. Moldrup. 2003. Signal transducer and activator of transcription 5 activation is sufficient to drive transcriptional induction of cyclin D2 gene and proliferation of rat pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol.* 17:945-58.
- Gil, J., P. Kerai, M. Lleonart, D. Bernard, J.C. Cigudosa, G. Peters, A. Carnero, and D. Beach. 2005. immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc. *Cancer Res.* 65:2179-85.
- Gouilleux, F., C. Pallard, I. Dusanter-Fourt, H. Wakao, L.A. Haldosen, G. Norstedt, D. Levy, and B. Groner. 1995. Prolactin, growth hormone, erythropoietin and granulocyte-macrophage colony stimulating factor induce MGF-Stat5 DNA binding activity. *EMBO J.* 14:2005-13.
- Guney, I., S. Wu, and J.M. Sedivy. 2006. Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16(INK4a). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:3645-50.
- Harper, J.W., S.J. Elledge, K. Keyomarsi, B. Dynlacht, L.-H. Tsai, P. Zhang, S. Dobrowolski, C. Bai, L. Connell-Crowley, E. Swindell, M.P. Fox, and N. Wei. 1995. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell.* 6:387-400.
- Hermeking, H., C. Rago, M. Schuhmacher, Q. Li, J.F. Barrett, A.J. Obaya, B.C. O'Connell, M.K. Mateyak, W. Tam, F. Kohlhuber, C.V. Dang, J.M. Sedivy, D. Eick, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 2000. Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:2229-34.

- Hoover, R.R., M.J. Gerlach, E.Y. Koh, and G.Q. Daley. 2001. Cooperative and redundant effects of STAT5 and Ras signaling in BCR/ABL transformed hematopoietic cells. *Oncogene*. 20:5826-35.
- Huot, T.J., J. Rowe, M. Harland, S. Drayton, S. Brookes, C. Gooptu, P. Purkis, M. Fried, V. Bataille, E. Hara, J. Newton-Bishop, and G. Peters. 2002. Biallelic mutations in p16(INK4a) confer resistance to Ras- and Ets-induced senescence in human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 22:8135-43.
- Kato, Y., A. Iwama, Y. Tadokoro, K. Shimoda, M. Minoguchi, S. Akira, M. Tanaka, A. Miyajima, T. Kitamura, and H. Nakauchi. 2005. Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J Exp Med*. 202:169-79.
- Lavau, C., A. Marchio, M. Fagioli, J. Jansen, B. Falini, P. Lebon, F. Grosveld, P.P. Pandolfi, P.G. Pelicci, and A. Dejean. 1995. The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene*. 11:871-876.
- Lawlor, E.R., L. Soucek, L. Brown-Swigart, K. Shchors, C.U. Bialucha, and G.I. Evan. 2006. Reversible kinetic analysis of Myc targets in vivo provides novel insights into Myc-mediated tumorigenesis. *Cancer Res*. 66:4591-601.
- Li, H., T.J. Ahonen, K. Alanen, J. Xie, M.J. LeBaron, T.G. Pretlow, E.L. Ealley, Y. Zhang, M. Nurmi, B. Singh, P.M. Martikainen, and M.T. Nevalainen. 2004. Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *Cancer Res*. 64:4774-82.
- Lowe, S.W., E. Cepero, and G. Evan. 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 432:307-15.
- Mallette, F.A., M.F. Gaumont-Leclerc, and G. Ferbeyre. 2007. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev*. 21:43-8.

- Mallette, F.A., S. Goumard, M.F. Gaumont-Leclerc, O. Moiseeva, and G. Ferbeyre. 2004. Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene*. 23:91-9.
- Malumbres, M., I. Perez De Castro, M.I. Hernandez, M. Jimenez, T. Corral, and A. Pellicer. 2000. Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b). *Mol Cell Biol*. 20:2915-25.
- Martino, A., J.H.t. Holmes, J.D. Lord, J.J. Moon, and B.H. Nelson. 2001. Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2. *J Immunol*. 166:1723-9.
- Moriggl, R., D.J. Topham, S. Teglund, V. Sexl, C. McKay, D. Wang, A. Hoffmeyer, J. van Deursen, M.Y. Sangster, K.D. Bunting, G.C. Grosveld, and J.N. Ihle. 1999. Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity*. 10:249-59.
- Muller, H., A.P. Bracken, R. Vernell, M.C. Moroni, F. Christians, E. Grassilli, E. Prosperini, E. Vigo, J.D. Oliner, and K. Helin. 2001. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev*. 15:267-85.
- Nevalainen, M.T., J. Xie, J. Torhorst, L. Bubendorf, P. Haas, J. Kononen, G. Sauter, and H. Rui. 2004. Signal transducer and activator of transcription-5 activation and breast cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 22:2053-60.
- Nieborowska-Skorska, M., G. Hoser, P. Kossev, M.A. Wasik, and T. Skorski. 2002. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Blood*. 99:4531-9.
- Onishi, M., T. Nosaka, K. Misawa, A.L. Mui, D. Gorman, M. McMahon, A. Miyajima, and T. Kitamura. 1998. Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol Cell Biol*. 18:3871-9.
- Pearson, M., R. Carbone, C. Sebastiani, M. Cioce, M. Fagioli, S. Saito, Y. Higashimoto, E. Appella, S. Minucci, P.P. Pandolfi, and P.G. Pelicci. 2000. PML regulates p53

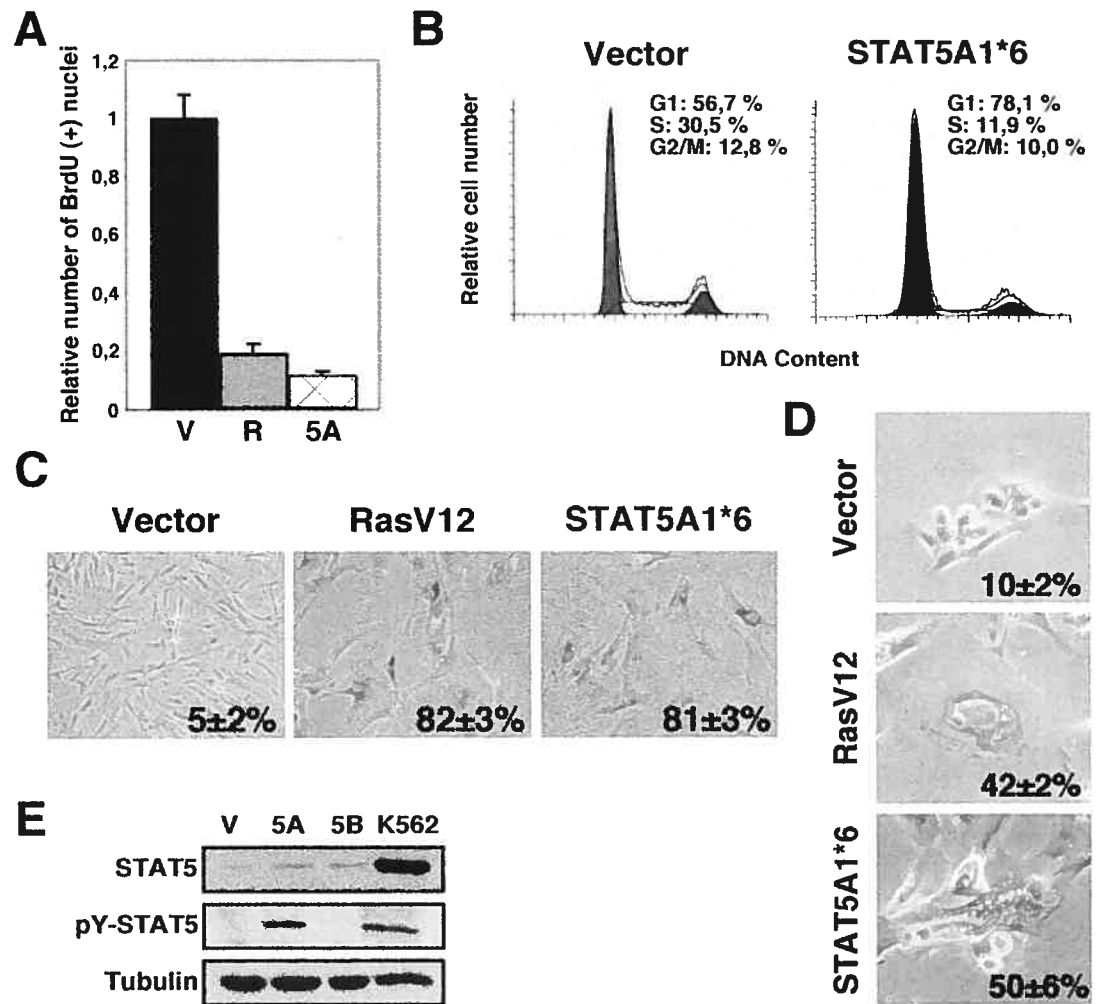
- acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*. 406:207-10.
- Ren, S., H.R. Cai, M. Li, and P.A. Furth. 2002. Loss of Stat5a delays mammary cancer progression in a mouse model. *Oncogene*. 21:4335-9.
- Sears, R., F. Nuckolls, E. Haura, Y. Taya, K. Tamai, and J.R. Nevins. 2000. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev*. 14:2501-14.
- Serrano, M., A.W. Lin, M.E. McCurrach, D. Beach, and S.W. Lowe. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 88:593-602.
- Sherr, C.J. 1994. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*. 79:551-555.
- Sillaber, C., F. Gesbert, D.A. Frank, M. Sattler, and J.D. Griffin. 2000. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood*. 95:2118-25.
- Smith, K.P., M. Byron, B.C. O'Connell, R. Tam, C. Schorl, I. Guney, L.L. Hall, P. Agrawal, J.M. Sedivy, and J.B. Lawrence. 2004. c-Myc localization within the nucleus: evidence for association with the PML nuclear body. *J Cell Biochem*. 93:1282-96.
- Sonoyama, J., I. Matsumura, S. Ezoe, Y. Satoh, X. Zhang, Y. Kataoka, E. Takai, M. Mizuki, T. Machii, H. Wakao, and Y. Kanakura. 2002. Functional cooperation among Ras, STAT5, and phosphatidylinositol 3-kinase is required for full oncogenic activities of BCR/ABL in K562 cells. *J Biol Chem*. 277:8076-82.
- Wakao, H., F. Gouilleux, and B. Groner. 1994. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *Embo J*. 13:2182-91.
- Weniger, M.A., I. Melzner, C.K. Menz, S. Wegener, A.J. Bucur, K. Dorsch, T. Mattfeldt, T.F. Barth, and P. Moller. 2006. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in

- classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*. 25:2679-84.
- Xi, S., Q. Zhang, W.E. Gooding, T.E. Smithgall, and J.R. Grandis. 2003. Constitutive activation of Stat5b contributes to carcinogenesis in vivo. *Cancer Res*. 63:6763-71.
- Yamashita, H., and H. Iwase. 2002. The role of stat5 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer*. 9:312-8.
- Yang, H.S., and P.W. Hinds. 2003. Increased ezrin expression and activation by CDK5 coincident with acquisition of the senescent phenotype. *Mol Cell*. 11:1163-76.
- Yao, Z., Y. Cui, W.T. Watford, J.H. Bream, K. Yamaoka, B.D. Hissong, D. Li, S.K. Durum, Q. Jiang, A. Bhandoola, L. Hennighausen, and J.J. O'Shea. 2006. Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:1000-5.
- Zou, X., D. Ray, A. Aziyu, K. Christov, A.D. Boiko, A.V. Gudkov, and H. Kiyokawa. 2002. Cdk4 disruption renders primary mouse cells resistant to oncogenic transformation, leading to Arf/p53-independent senescence. *Genes Dev*. 16:2923-34.

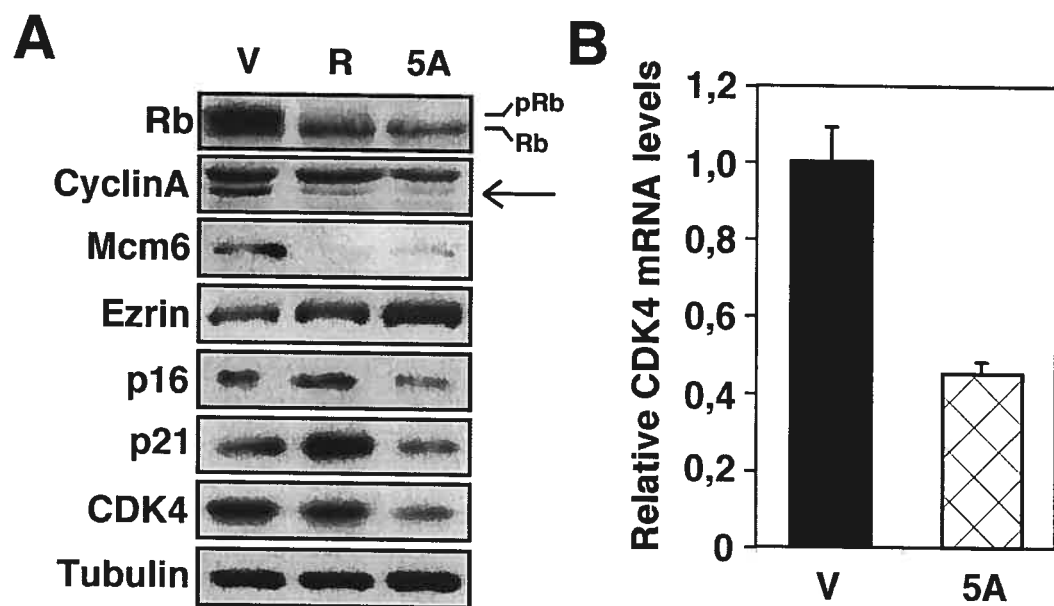


## Figures and legends

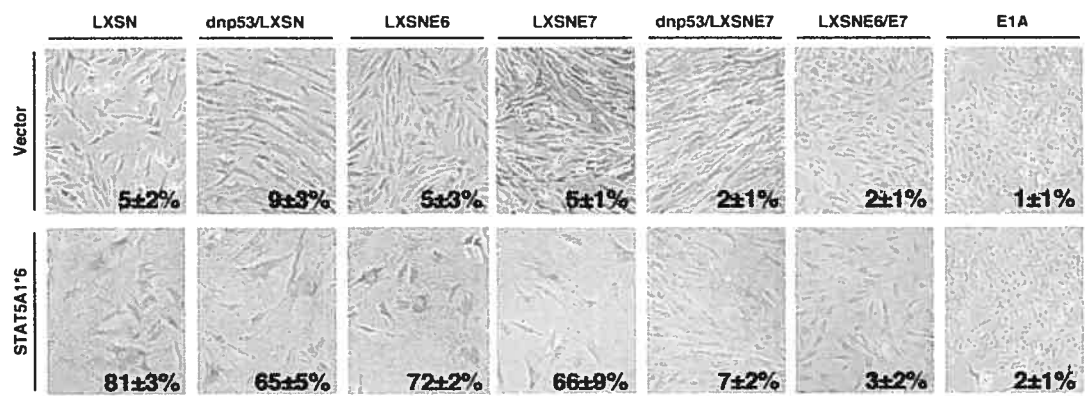
**Figure 1. STAT5A activation induces senescence in human cells.** **A)** BrdU incorporation of IMR90 cells with a control vector (V), oncogenic *ras* (R) or STAT5A1\*6 (5A). **B)** Cell cycle analysis of IMR90 cells infected with control vector or STAT5A1\*6. **C)** SA- $\beta$ -gal staining of normal human diploid fibroblasts IMR90 cells infected with control vector, RasV12 or STAT5A1\*6. **D)** SA- $\beta$ -gal staining of human mammary epithelial cells infected with control vector, RasV12 or STAT5A1\*6. **E)** Western blot analysis of STAT5 and phospho-STAT5 in IMR90 cells expressing a control vector (V) or its derivatives expressing STAT5A1\*6 (5A) or STAT5B1\*6 (5B), and in K562 cells. For C) and D), the percent and standard deviation of SA- $\beta$ -gal positive cells is indicated at the bottom right of each panel. Data represent three independent experiments done with cells collected six days post-selection.

**Figure 1**

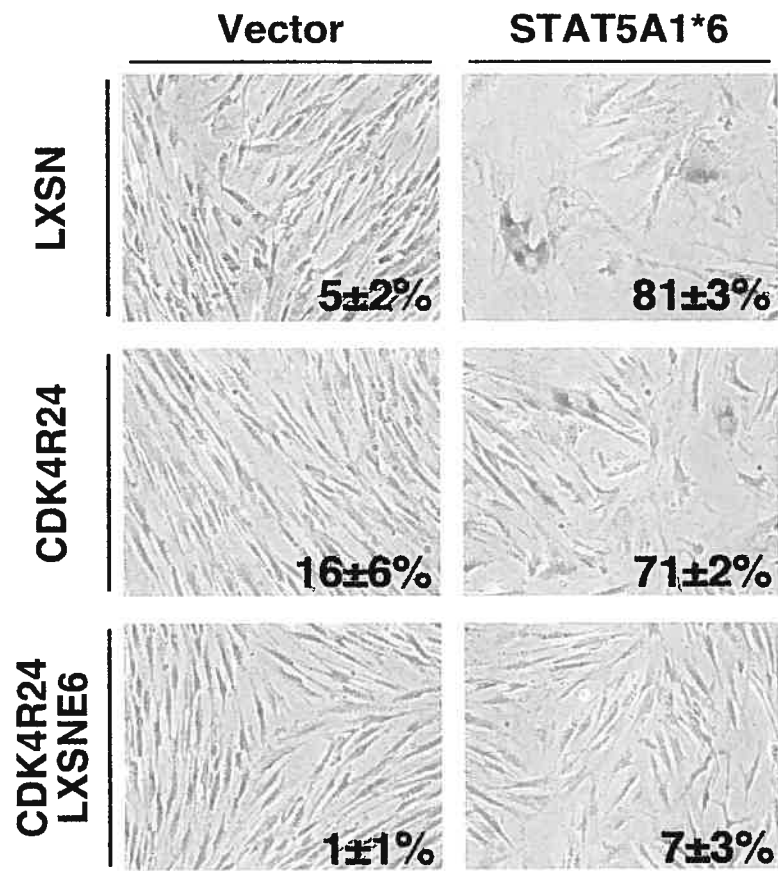
**Figure 2. STAT5A engages the Rb tumor suppressor pathway by downregulating CDK4.** **A)** Western blot analysis of the Rb pathway in IMR90 cells bearing control vector (V), RasV12 (R) or STAT5A1\*6 (5A). **B)** Quantitative real-time PCR for CDK4 in IMR90 cells infected with a control vector (V) or STAT5A1\*6 (5A).

**Figure 2**

**Figure 3. p53 and Rb requirement for STAT5-induced senescence in human cells.** SA- $\beta$ -gal staining 6 days post-selection of IMR90 cells bearing the empty vector LXS<sub>N</sub>, LXS<sub>N</sub> and dominant negative p53 (dnp53); LXSNE6; LXSNE7; dnp53 and LXSNE7; LXSNE6/E7 or E1A, and then infected with an empty vector (pBabe) or its derivative expressing STAT5A1\*6. Percent and standard deviation of SA- $\beta$ -gal positive cells is indicated at the bottom right of each panel. Data represent three independent experiments done with cells collected six days post-selection.

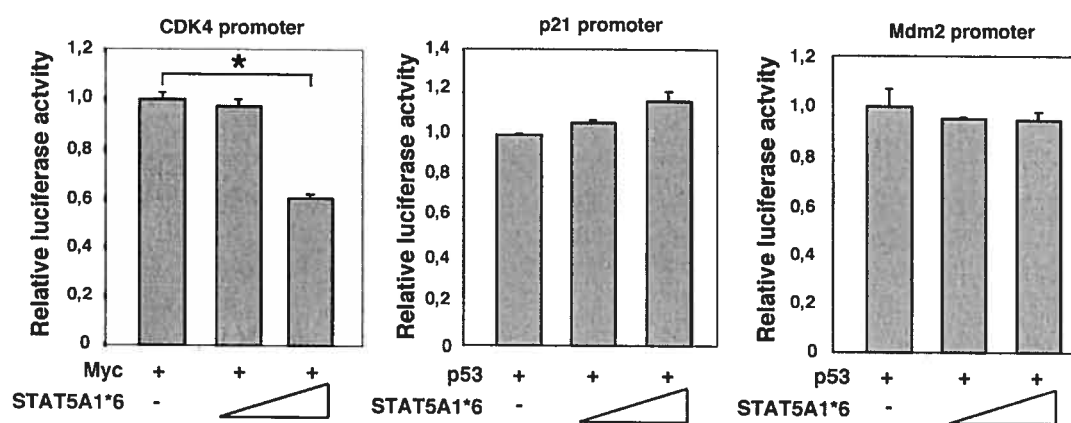
**Figure 3**

**Figure 4. CDK4 cooperates with E6 to bypass STAT5A-induced senescence.** SA- $\beta$ -gal staining of IMR90 cells bearing control vector or its derivative expressing STAT5A1\*6 infected with empty vectors, vectors expressing CDK4R24 or both CDK4R24 and E6. Percent and standard deviation of SA- $\beta$ -gal positive cells is indicated at the bottom right of each panel. Data represent three independent experiments done with cells collected six days post-selection.

**Figure 4**

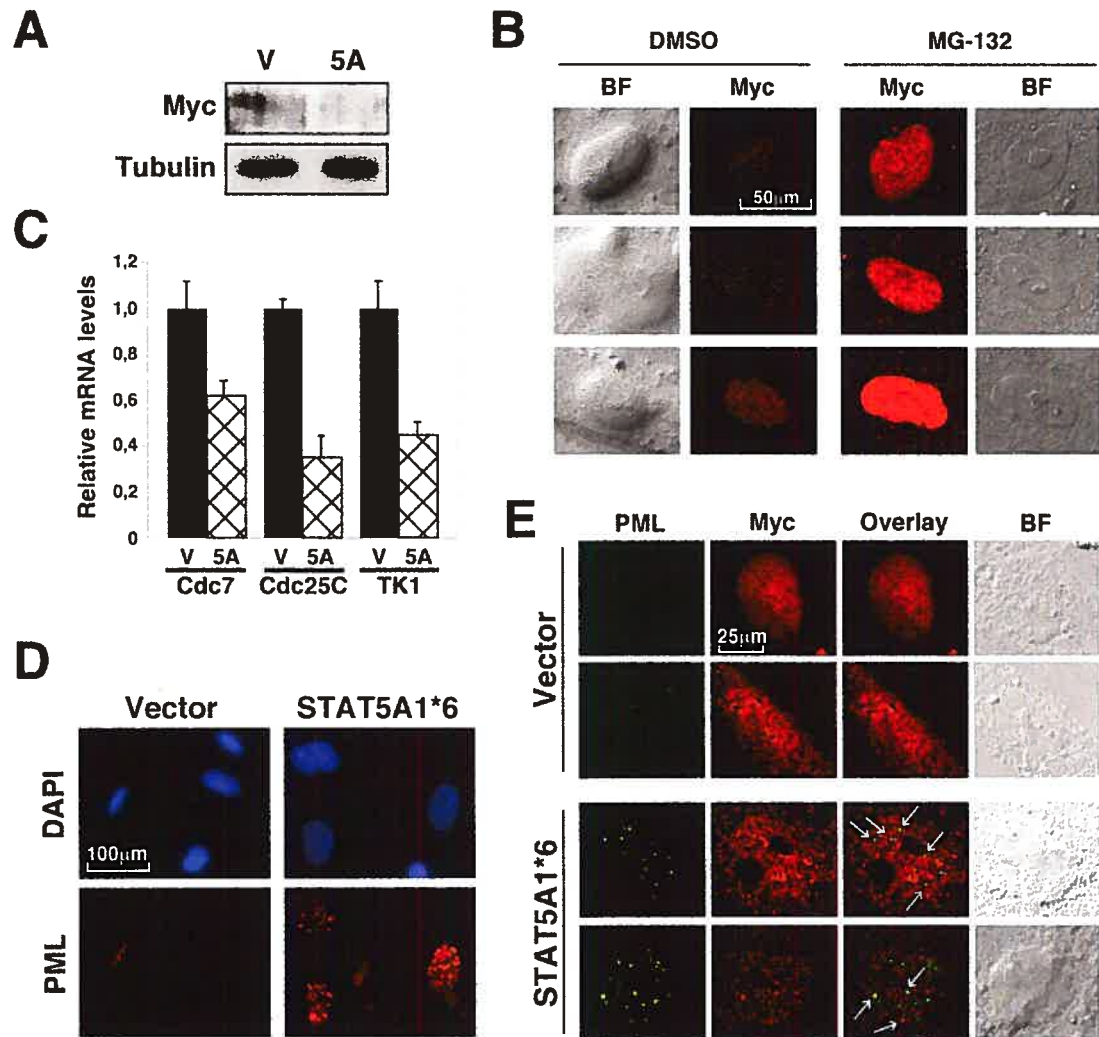


**Figure 5. STAT5A antagonizes Myc on the CDK4 promoter.** Dual-luciferase assay in H1299 cells transiently transfected with the CDK4, p21 or Mdm2 promoter firefly luciferase plasmid, the  $\beta$ -globin promoter *Renilla* luciferase plasmid and the indicated vectors. Asterisk represents a significant decrease of luciferase activity (Student's t test  $p < 0,001$ ) compared to control cells.

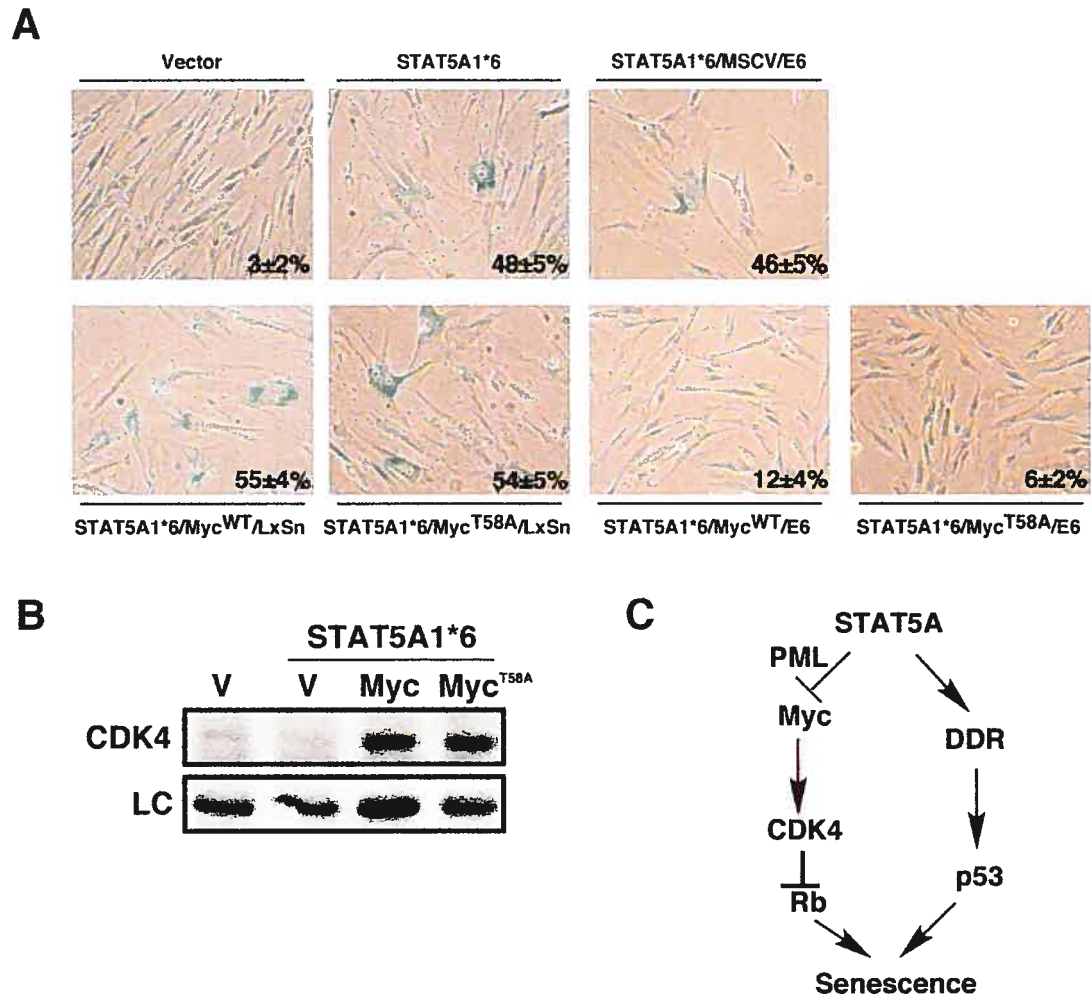
**Figure 5**

**Figure 6. Decrease of Myc activity during STAT5A-induced senescence and Myc localization to PML bodies.** **A)** Western blot of Myc during STAT5A-induced senescence in IMR90 cells. **B)** Indirect immunofluorescence of Myc in STAT5A-induced senescence. IMR90 cells infected with STAT5A1\*6 were either treated with DMSO or the proteasome inhibitor MG-132 at 5 $\mu$ g/mL for 4 hrs. **C)** Quantitative real time RT-PCR against different Myc-target genes in IMR90 cells infected with a control vector or STAT5A1\*6. RNA samples were collected 6 days post-selection. **D)** PML immunofluorescence of IMR90 cells with control vector or STAT5A1\*6. **E)** Co-localization of Myc in a subset of PML bodies during STAT5-induced senescence using confocal microscopy. Arrows indicate co-localization of Myc to PML bodies.

Figure 6

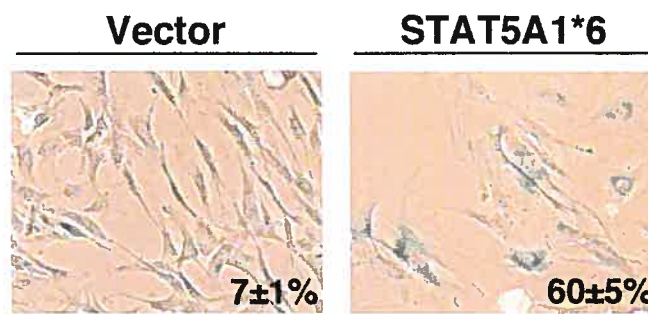


**Figure 7. Myc cooperates with E6 to bypass STAT5A-induced senescence.** A) SA- $\beta$ -gal staining of IMR90 cells bearing control vector or its derivative expressing ca-STAT5A infected with empty vectors, or vectors expressing Myc, Myc<sup>T58A</sup> and E6 as indicated. B) Western blot analysis of CDK4 expression in STAT5-infected cells expressing Myc or Myc<sup>T58A</sup>. The loading control (LC) represents a non-specific band detected equally in all samples. C) Model for STAT5A-induced senescence indicating independent connections for the Rb and the p53 pathways to the senescence program.

**Figure 7**

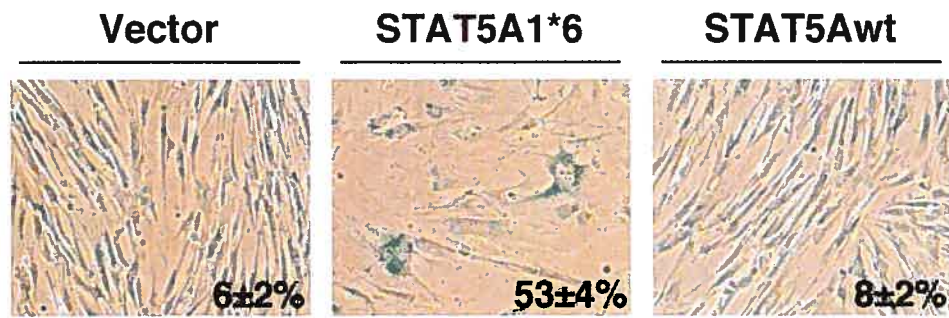
## **Supplementary Figures and legends**

**Supplementary figure 1. Induction of senescence by STAT5A1\*6 in BJ fibroblasts.** STAT5A1\*6 induces senescence in BJ human fibroblasts. SA- $\beta$ -gal staining 6 days post-selection. The percent and standard deviation of SA- $\beta$ -gal positive cells is indicated at the bottom right of each panel. Data represent three independent experiments done with cells collected six days post-selection.

**Supplementary figure 1**

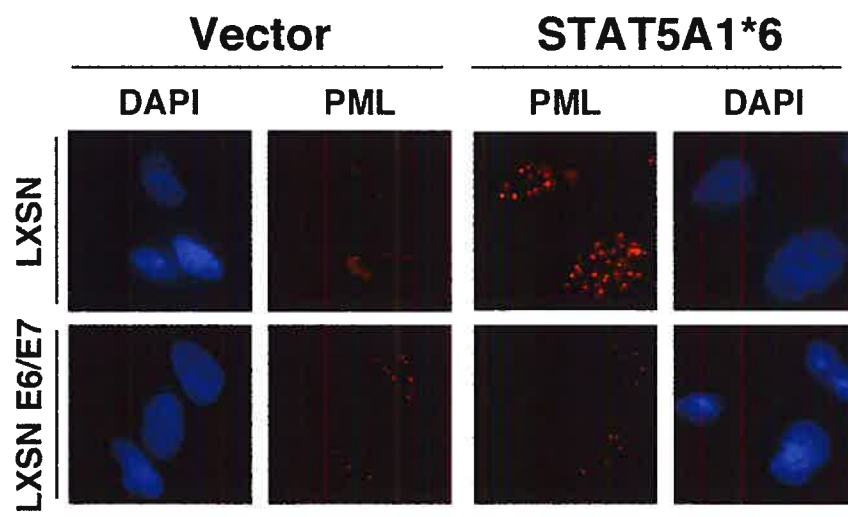


**Supplementary figure 2. Inability of wild type STAT5A to induce senescence.** SA- $\beta$ -gal of IMR90 cells infected with empty vector, STAT5A1\*6 or STAT5Awt. The percent and standard deviation of SA- $\beta$ -gal positive cells is indicated at the bottom right of each panel. Data represent three independent experiments done with cells collected six days post-selection.

**Supplementary figure 2**

**Supplementary figure 3. Disruption of p53 and Rb pathways blocks PML bodies formation by STAT5A1\*6.** Indirect immunofluorescence of PML in vector or STAT5A1\*6-infected IMR90 expressing control empty vector LXS<sub>N</sub> or LXS<sub>N</sub>E6/E7 at day 6 post-selection. Expression of E6 and E7 blocks formation of PML bodies in normal human fibroblasts but do not reduce PML protein levels <sup>(2)</sup>.

## Supplementary figure 3



## Supplementary methods

### Retroviral vectors

pBabe, pBabeRas, pLPC, pLPCE1A, pWZL and pWZLRas were previously described (1), LXS<sub>N</sub>, LXSNE6, LXSNE7, LXSNE6/E7 were provided by Dr. D. Galloway, MSCV-Myc and MSCV-MycT58A were provided by S. W. Lowe. STAT5A1\*6 and STAT5B1\*6 were subcloned from pMXSTAT5A1\*6 and pMXSTAT5B1\*6 (3) into pBabe as EcoRI-SalI fragments.

### Antibodies for immunoblots

Primary antibodies used were anti-Rb (G3-245, 1:250, BD Pharmingen), anti-p16<sup>INK4a</sup> (F-12, 1:500, Santa Cruz), anti-CDK4 (C-22, 1:250, Santa Cruz), anti-cyclin A (C-19, 1:500, Santa Cruz), anti-MCM6 (provided by Dr. Heidebrecht, 1:10), anti-Ezrin (07-130, 1:1000, Upstate), anti-p19<sup>ARF</sup> (1:500, Novus), anti-p53 (9282, 1:1000, Cell Signaling), anti-acetyl-p53<sup>K320</sup> (GEA2044-1, 1:50000, Genex Bioscience), anti-Hdm2 (2A10, from A. Levine, 1:250), anti-p21 (C-19, 1:750 Santa Cruz), anti-phospho-STAT5 (9351, 1:1000, Cell Signaling), anti-STAT5 (G-2, 1:1000, Santa Cruz), anti-PML (PG-M3, 1:200, Santa Cruz), and anti- $\alpha$ -tubulin (B-5-1-2, 1:5000, Sigma).

### Antibodies for indirect immunofluorescence

Primary antibodies used for immunofluorescence were anti-p53 (CM1, 1:50, Novocastra) and anti-PML (PG-M3, 1:400, Santa Cruz). Secondary antibodies used were AlexaFluor 488 or AlexaFluor 568 conjugated secondary antibodies (1:1000, Molecular Probes).

## Supplementary references

1. Ferbeyre, G., E. de Stanchina, E. Querido, N. Baptiste, C. Prives, and S. W. Lowe. 2000. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 14:2015-2027.
2. Mallette, F. A., S. Goumard, M. F. Gaumont-Leclerc, O. Moiseeva, and G. Ferbeyre. 2004. Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene* 23:91-99.
3. Onishi, M., T. Nosaka, K. Misawa, A. L. Mui, D. Gorman, M. McMahon, A. Miyajima, and T. Kitamura. 1998. Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol Cell Biol* 18:3871-9.

## **ARTICLE 3: The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence**

### **Mise en contexte**

Les lésions pré-néoplasiques humaines expriment de nombreux marqueurs trahissant la présence d'une réponse de dommage à l'ADN activée. Toutefois, lorsque les tumeurs progressent en lésions plus agressives, la réponse de dommage à l'ADN est abrogée suggérant que l'inactivation de cette réponse de dommage à l'ADN constitue un prérequis à la progression tumorale.

Afin de déterminer le rôle de la réponse de dommage à l'ADN lors du mécanisme de suppression tumorale que constitue la sénescence, nous avons utilisé un shRNA ciblant ATM. Il fut alors possible de préciser le rôle critique que joue la réponse de dommage à l'ADN lors de la sénescence induite par les oncogènes Ras, STAT5 et E2F1.

Cet article a été publié en janvier 2007 dans *Genes & Development* aux pages 43-48.

Note: Contribution(s) des auteurs:

FAM: Infections de cellules primaires, essais de prolifération (BrdU), immunofluorescences, essais SA- $\beta$ -Gal, immunobuvardages et participation à l'écriture du manuscrit.

MFGL: Aide pour la culture cellulaire.

GF: Quantifications des données d'immunofluorescence, supervision générale et écriture du manuscrit.

# **The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence**

Frédéric A. Mallette, Marie-France Gaumont-Leclerc and Gerardo Ferbeyre.  
Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville,  
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

Keywords: STAT5, RasV12, E2F1, ATM, DNA damage, p53, senescence.

Running title: Oncogenes, DNA damage signaling and senescence.

Correspondence to:

Gerardo Ferbeyre, MD, PhD  
Université de Montréal  
Département de Biochimie, E-515  
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville  
Montréal, Qc H3C 3J7  
Phone 514 343-7571  
Fax 514 343-2210  
Email: [g.ferbeyre@umontreal.ca](mailto:g.ferbeyre@umontreal.ca)



## Abstract

Here we report that RNA interference against ATM inhibited p53 accumulation in cells expressing oncogenic STAT5 and cooperated with Rb inactivation to suppress STAT5A-induced senescence. Knocking down ATM was also effective to bypass E2F1-induced senescence and in combination with Rb inactivation, inhibited RasV12-induced senescence. Cells that senesced in response to ca-STAT5A or RasV12 accumulated DNA damage foci, activated ATM, ATR, Chk1 and Chk2, indicating that aberrant oncogene activation induces a DNA damage signaling response. Intriguingly, bypassing oncogene-induced senescence by inactivation of p53 and Rb did not eliminate the accumulation of oncogene-induced DNA damage foci (ODDI) suggesting a mechanism that may limit transformation in immortalized cells.

## Introduction

Normal cells possess natural defenses against transformation into cancer cells. Oncogenes, such as *myc* or *E1A*, trigger a cell death program while oncogenes such as *ras*, *raf* or *mek*, induce a permanent growth arrest program indistinguishable from the senescence response previously characterized during serial passage of primary fibroblasts (Lowe et al. 2004). The tumor suppressor pathways controlled by p53 and Rb are necessary for the senescence program (Serrano et al. 1997) and other tumor suppressors have also been linked to senescence (Lowe et al. 2004). Although Rb and p53 represent two important control points in the senescence network, the proteins connecting oncogenic activity to these tumor suppressors are also critical for an efficient antitumor response. Several candidate proteins have been proposed to connect oncogenes to p53. The first described was ARF, which is activated by multiple oncogenic stimuli (de Stanchina et al. 1998; Zindy et al. 1998; Zindy et al. 2003) and is required for induction of p53 and senescence in response to oncogenic *ras* in mouse primary fibroblasts (Palmero et al. 1998; Ferbeyre et al. 2002) or keratinocytes (Lin and Lowe 2001). On the other hand, oncogenic *ras* does not induce p53 via ARF in human fibroblasts and, as a consequence, ARF is not required for *ras*-induced senescence in these cells (Wei et al. 2001). ARF was also dispensable for p53 activation and apoptosis after Rb inactivation and E2F induction in mice (Tolbert et al. 2002). Other candidates connecting oncogenic *ras* to p53 are the p38 MAPK pathway (Deng et al. 2004), PML protein (Ferbeyre et al. 2000; Pearson et al. 2000), PEA-15 (Gaumont-Leclerc et al. 2004) and seladin (Wu et al. 2004). In summary, multiple signaling pathways seem to connect RasV12 to p53 and no unique sensor of oncogenic activity has yet emerged from these studies.

To investigate the nature of the signals that activate the p53 pathway during senescence, we thought that it would be valuable to compare two oncogenes that activate different signaling pathways. We anticipated that each oncogene might trigger specific

pathways but also a general cellular stress that could signal an oncogenic threat in the cells. Therefore, we generated a novel model of oncogene-induced senescence using a constitutively active allele of STAT5 (ca-STAT5). STAT5A together with STAT5B are transcription factors that mediate cytokine and hormone signals. Their constitutive activation has been observed in several human cancers and they are oncogenic in cell culture models and transgenic animals (Bowman et al. 2000). In this study, we report that knocking down ATM expression with a short hairpin RNA blocked p53 induction in response to aberrant STAT5A activation and bypassed the senescence response to this oncogene when the Rb pathway was also inactivated. Knocking down ATM also inhibited E2F1-induced senescence and in combination with Rb inactivation, suppressed RasV12-induced senescence. In agreement, normal cells expressing ca-STAT5 or RasV12 accumulated DNA damage foci and exhibited a constitutive activation of the DNA damage signaling pathway. Bypassing senescence by inactivating the p53 and the Rb tumor suppressor pathways did not eliminate the DNA damage foci, explaining why they persist in pre-malignant lesions and may constitute an additional barrier for full oncogenic transformation.

## Results and discussion

### Induction of p53 and senescence by ca-STAT5A requires ATM

To investigate the pathways linking oncogenes to p53 and senescence, we first infected normal human diploid fibroblasts IMR90 or BJ (data not shown) with retroviruses expressing a constitutive allele of STAT5A (ca-STAT5A) also known as STAT5A1\*6 (Onishi et al. 1998) or an empty vector. Ca-STAT5A induced a cell cycle arrest with the characteristics of cellular senescence (Figure 1A) including low BrdU incorporation and the nuclear accumulation of the p53 tumor suppressor protein (Figure 1B). In previous studies, we found that the ATM kinase and the DNA damage signaling pathway was required for senescence in response to  $\beta$ -interferon (Moiseeva et al. 2006). To investigate if a similar pathway was active in cells expressing ca-STAT5A we knocked down ATM expression using an already validated small hairpin RNA (shATM) (Mukhopadhyay et al. 2005; Moiseeva et al. 2006) (Figure 1C). Cells expressing shATM accumulated much less p53 than cells expressing a control hairpin (Figure 1D) but did not bypass the senescent response to ca-STAT5A in normal human fibroblasts (Fig 1E). STAT5A-induced senescence was neither bypassed in cells expressing the human papillomavirus oncoproteins E6 or E7, which inactivate the p53 and the Rb pathway respectively. However, coexpressing both E6 and E7 did circumvent ca-STAT5A-induced senescence (Figure 1E). In agreement with the ability of shATM to inhibit p53 accumulation in response to ca-STAT5A, combining shATM with E7, but not with E6, also blocked ca-STAT5A-induced senescence (Figure 1E). In this way, shATM acted genetically as a p53 suppressor. We concluded that either the p53 or the Rb pathway is sufficient for the senescence response to STAT5A and that the p53 pathway was activated via the DNA damage responsive kinase ATM.

To extend these results to other oncogenes, we studied the effect of shATM on the senescence response to E2F1 and RasV12. E2F1-induced senescence can be rescued upon inactivation of p53 alone (Dimri et al. 2000). In agreement, shATM rescued E2F1-induced senescence as efficiently as an shRNA against p53 (Supplementary figure 1). In contrast, to STAT5A-induced senescence, RasV12-induced senescence is more complex and can not be entirely rescued with E6 and E7 (Mallette et al. 2004). Co-expression of RasV12 with E7 and shATM did not prevent the senescence of most cells in the population, but after 12 days in cultures we visualized colonies of SA- $\beta$ -Gal negative cells that could further propagated with few signs of senescence (Figure 1E). Taken together, these results suggest that the DNA damage signaling pathway is critical for the senescence response to oncogenes.

### **STAT5A and RasV12 induce a constitutive activation of the DNA damage signaling pathway**

ATM is activated by double stranded breaks and other forms of damage to DNA (Bakkenist and Kastan 2003). These lesions can be readily visualized using antibodies against  $\gamma$ H2AX, which is a phosphorylated version of the histone H2AX at serine 139 (d'Adda di Fagagna et al. 2003; Bartkova et al. 2005; Gorgoulis et al. 2005). Staining with these antibodies revealed the presence of DNA damage foci in cells that were induced to senesce by oncogenic STAT5A, oncogenic *ras* or hydrogen peroxide (Figure 2A, B).

To further characterize the DNA damage foci in cells expressing ca-STAT5A or RasV12, we performed confocal immunofluorescence to reveal other components of the DNA damage foci. First, these foci were labeled with an antibody against 53BP1 (Figure 3A and supplementary figures 2 and 3), a component of the DNA damage response required for p53 activation (Wang et al. 2002). Next, these foci were stained by an antibody that recognizes ATM phosphorylated at serine 1981, which indicates activation of this kinase (Bakkenist and Kastan 2003) (Figure 3A and supplementary figure 3). In agreement,

we found that antibodies against the phospho-epitope pS/TQ, which is the consensus phosphorylation site of ATM and ATR, also labeled them (Figure 3B). Quantitation of the data using indirect immunofluorescence, confirmed again that cells expressing oncogenic STAT5A have multiple DNA damage foci when compared with normal cells expressing a vector control (Figure 3C). Foci containing  $\gamma$ H2AX or pS/TQ epitopes were more numerous than foci labeled by phospho-ATM<sup>S1981</sup> or the ATM target phospho-53BP1, suggesting that other PIKKs are active in senescent cells. In accord, we detected numerous ATR foci in cells expressing either RasV12 or ca-STAT5A (supplementary figure 4). However, the pattern of ATR staining was different from the pattern induced by replication arrest in cells treated with hydroxyurea (Supplementary figure 4), suggesting that the oncogenic pathway to ATR activation does not involve a classic S phase arrest. This is consistent with the fact that senescence induced by RasV12 (Serrano et al. 1997) or ca-STAT5A (data not shown) involves an arrest in G1. In addition, both ca-STAT5A and RasV12 induced Chk1 phosphorylation at serine 317, a site known to be phosphorylated by ATR (Zhao and Piwnica-Worms 2001) or ATM (Gatei et al. 2003). Intriguingly, ca-STAT5A induced Chk2 phosphorylation at threonine 68 (Figure 3D), while RasV12 induced phosphorylation of Chk2 at serine 19. Both sites are part of a cluster of S/TQ phosphorylation sites which are recognized by PIKK kinases such as ATM and ATR (Matsuoka et al. 2000). It is not presently clear why these two oncogenes induce a different phosphorylation pattern in Chk2, but it is known that all S/TQ sites in the N terminus of Chk2 are individually sufficient to activate the protein (Xu et al. 2002). As expected, shATM blocked the phosphorylation of Chk2 at threonine 68 in cells expressing ca-STAT5A (Figure 3E). Together, these results suggest that DNA damage foci are constitutively signaling through protein phosphorylation in cells expressing ca-STAT5A or RasV12.

DNA damage foci that accumulate in replicative senescence are organized around short telomeres, which may look as double stranded breaks (d'Adda di Fagagna et al. 2003). However, as shown in Supplementary figure 5, oncogene-induced DNA damage foci did

not colocalize with telomeres as identified with an antibody against TRF2. In agreement, expression of telomerase alone or in combination with E6 or E7 did not rescue senescence in response to ca-STAT5A (data not shown) or RasV12 (Wei et al. 1999). These results suggest that oncogenes do not activate the DNA damage signaling pathway by promoting telomere shortening or uncapping. The activation of the DNA damage signaling pathway we observe in oncogene-induced senescence can be secondary to multiple kinds of damage to DNA and chromatin induced by aberrant oncogenic activity (Rouse and Jackson 2002). This response can be activated by DNA damaging agents such as reactive oxygen species (Lee et al. 1999; Vafa et al. 2002; Wu et al. 2004; Moiseeva et al. 2006) but also by stalled replications forks (Osborn et al. 2002), altered nucleus-cytoplasmic ratio (Shimuta et al. 2002) or after changes in the chromatin (Bakkenist and Kastan 2003; Hoek and Stillman 2003; Ye et al. 2003). Hence, oncogenes activating dissimilar signaling pathways such as RasV12 or STAT5A may induce DNA damage foci through different mechanisms. We propose to call these foci as Oncogene-induced DNA damage foci or ODDI.

### **Oncogene-induced DNA damage foci (ODDI) persist in cells that bypassed senescence.**

The presence of DNA damage foci characterized both advanced human cancers and premalignant lesions (DiTullio et al. 2002; Bartkova et al. 2005; Gorgoulis et al. 2005). Since those tumors must have already found a way around the senescent barrier we reasoned that bypassing oncogene-induced senescence might not eliminate ODDI. To investigate this point we used E6 and E7 or E1A to bypass the senescent arrest to both ca-STAT5A and RasV12. As expected, cells expressing E6, E7 and ca-STAT5A, E1A and ca-STAT5A, E6, E7 and RasV12 or E1A and RasV12 also contained ODDI (Figure 4). These foci were also labeled by the antibody recognizing phospho-ATM Ser1981 (Supplementary fig. 6) and phospho-53BP1 (data not shown) suggesting that ATM is active in cells that escape senescence. A quantitation of phospho-ATM foci in senescent cells and in cells that bypassed senescence with E1A revealed that the average number of foci did not change

(Supplementary fig. 6). Hence, DNA damage signaling persists after bypassing senescence where it may provide additional antiproliferative barriers. In fact, it is known that bypassing senescence is not sufficient to transform primary cells (Morales et al. 1999; Dannenberg et al. 2000; Peeper et al. 2001). One possibility is that DNA damage foci activate other barriers to halt cellular transformation.

In conclusion, we propose that oncogenic activity is sensed on the DNA, leading to the formation of oncogene-induced DNA damage foci (ODDI) and the activation of the DNA damage signaling pathway. Early in the tumorigenesis process this pathway leads to p53 activation and senescence but it may also mediate tumor suppression in cells that escape senescence.



## Material and methods

### Cells and Retroviruses

IMR90 cells (ATCC) and BJ normal fibroblasts (S. Lowe) were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Utah) and 1% penicilline G/ streptomycin sulfate (GIBCO). pBabe, pBabeRas, pLPC, pLPCE1A, pWZL and pWZLRas were previously described (Ferbeyre et al. 2000), and LXS<sub>N</sub>, LXSNE6, LXSNE7, LXSNE6/E7 were provided by Dr. D. Galloway. STAT5A1\*6 and STAT5B1\*6 were subcloned from pMXSTAT5A1\*6 and pMXSTAT5B1\*6 (Onishi et al. 1998) into pBabe as EcoRI-SalI fragments. shRNA against ATM (shATM) was described by Mukhopadhyay et al. Retroviral-mediated gene transfer, BrdU incorporation, cell cycle analysis, senescence assays and fluorescence microscopy were done as described (Ferbeyre et al. 2000).

### Protein expression analysis

Cells were collected by trypsinization, washed with PBS, lysed in 100  $\mu$ L of SDS sample buffer (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % glycerol, 2 % SDS and 5% 2-mercaptoethanol) and boiled for 5 min. Twenty  $\mu$ g of total cell protein were separated on SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). Primary antibodies used were anti-phospho-Chk1<sup>S317</sup> (2344, 1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-Chk2<sup>T68</sup> (2661, 1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-Chk2<sup>S19</sup> (2666, 1:1000, Cell Signaling), anti-Chk2 (2662, 1:1000, Cell Signaling), anti-ATM (from M.B. Kastan, St. Jude Children's Research Hospital, TN) and anti- $\alpha$ -tubulin (B-5-1-2, 1:5000, Sigma). Signals were revealed after incubation with anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies coupled to peroxidase (Amersham) by using enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham) or Lumi-Light<sup>PLUS</sup> (Roche). Primary antibodies used for immunofluorescence were anti- $\gamma$ H2AX (JBW301,

1:200, Upstate), anti-53BP1 (Ab-1, 1:200, Oncogene), anti-pS/TQ epitopes (2851, 1:200, Cell Signaling), anti-phospho-ATM<sup>S1981</sup> (10H11.E12, 1:200, Cell Signaling), anti-TRF2 (4A794, 1:200, Upstate), anti-p53 mix (1801, 1:100 and 421, 1:100, Santa Cruz) and anti-p53 (CM1, 1:50, Novocastra). Secondary antibodies used were AlexaFluor 488 or AlexaFluor 568 conjugated secondary antibodies (1:1000, Molecular Probes).

## **Acknowledgements**

We thank E. Querido and members of the Ferbeyre laboratory for comments and technical assistance. Drs C. Autexier, D. Galloway, T. Kitamura and S. Lowe for cells and plasmids. This work was supported by CIHR to G.F. and a fellowship from Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) to F.A.M.

## References

- Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**: 499-506.
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J., and Bartek, J. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**: 864-870.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**: 2474-2488.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**: 194-198.
- Dannenberg, J.H., van Rossum, A., Schuijff, L., and te Riele, H. 2000. Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev* **14**: 3051-3064.
- de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Lowe, S.W. 1998. E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* **12**: 2434-2442.
- Deng, Q., Liao, R., Wu, B.L., and Sun, P. 2004. High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *J Biol Chem* **279**: 1050-1059.
- Dimri, G.P., Itahana, K., Acosta, M., and Campisi, J. 2000. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol* **20**: 273-285.

- DiTullio, R.A., Jr., Mochan, T.A., Venere, M., Bartkova, J., Sehested, M., Bartek, J., and Halazonetis, T.D. 2002. 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat Cell Biol* **4**: 998-1002.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Lin, A.W., Querido, E., McCurrach, M.E., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. 2002. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* **22**: 3497-3508.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S.W. 2000. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* **14**: 2015-2027.
- Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuasen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B.B., Bartek, J., and Khanna, K.K. 2003. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* **278**: 14806-14811.
- Gaumont-Leclerc, M.F., Mukhopadhyay, U.K., Goumard, S., and Ferbeyre, G. 2004. PEA-15 is inhibited by adenovirus E1A and plays a role in ERK nuclear export and Ras-induced senescence. *J Biol Chem* **279**: 46802-46809.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., DiTullio, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B., Kletsas, D., Yoneta, A., Herlyn, M., Kittas, C., and Halazonetis, T.D. 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**: 907-913.
- Hoek, M. and Stillman, B. 2003. Chromatin assembly factor 1 is essential and couples chromatin assembly to DNA replication in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12183-12188.
- Lee, A.C., Fenster, B.E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N.S., Hirai, T., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Howard, B.H., and Finkel, T. 1999. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* **274**: 7936-7940.

- Lin, A.W. and Lowe, S.W. 2001. Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5025-5030.
- Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**: 307-315.
- Mallette, F.A., Goumard, S., Gaumont-Leclerc, M.F., Moiseeva, O., and Ferbeyre, G. 2004. Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene* **23**: 91-99.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., and Elledge, S.J. 2000. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 10389-10394.
- Moiseeva, O., Mallette, F.A., Mukhopadhyay, U.K., Moores, A., and Ferbeyre, G. 2006. DNA Damage Signaling and p53-dependent Senescence after Prolonged beta-Interferon Stimulation. *Mol Biol Cell* **17**: 1583-1592.
- Morales, C.P., Holt, S.E., Ouellette, M., Kaur, K.J., Yan, Y., Wilson, K.S., White, M.A., Wright, W.E., and Shay, J.W. 1999. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* **21**: 115-118.
- Mukhopadhyay, U.K., Senderowicz, A.M., and Ferbeyre, G. 2005. RNA silencing of checkpoint regulators sensitizes p53-defective prostate cancer cells to chemotherapy while sparing normal cells. *Cancer Res* **65**: 2872-2881.
- Onishi, M., Nosaka, T., Misawa, K., Mui, A.L., Gorman, D., McMahon, M., Miyajima, A., and Kitamura, T. 1998. Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol Cell Biol* **18**: 3871-3879.
- Osborn, A.J., Elledge, S.J., and Zou, L. 2002. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* **12**: 509-516.
- Palmero, I., Pantoja, C., and Serrano, M. 1998. p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras [letter]. *Nature* **395**: 125-126.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P., and Pelicci, P.G. 2000. PML regulates

- p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* **406**: 207-210.
- Peeper, D.S., Dannenberg, J.H., Douma, S., te Riele, H., and Bernards, R. 2001. Escape from premature senescence is not sufficient for oncogenic transformation by Ras. *Nat Cell Biol* **3**: 198-203.
- Rouse, J. and Jackson, S.P. 2002. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* **297**: 547-551.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**: 593-602.
- Shimuta, K., Nakajo, N., Uto, K., Hayano, Y., Okazaki, K., and Sagata, N. 2002. Chk1 is activated transiently and targets Cdc25A for degradation at the Xenopus midblastula transition. *Embo J* **21**: 3694-3703.
- Tolbert, D., Lu, X., Yin, C., Tantama, M., and Van Dyke, T. 2002. p19(ARF) is dispensable for oncogenic stress-induced p53-mediated apoptosis and tumor suppression in vivo. *Mol Cell Biol* **22**: 370-377.
- Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T.K., Hampton, G.M., and Wahl, G.M. 2002. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* **9**: 1031-1044.
- Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P.B., and Elledge, S.J. 2002. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* **298**: 1435-1438.
- Wei, S., Wei, S., and Sedivy, J.M. 1999. Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer Res* **59**: 1539-1543.
- Wei, W., Hemmer, R.M., and Sedivy, J.M. 2001. Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts. *Mol Cell Biol* **21**: 6748-6757.

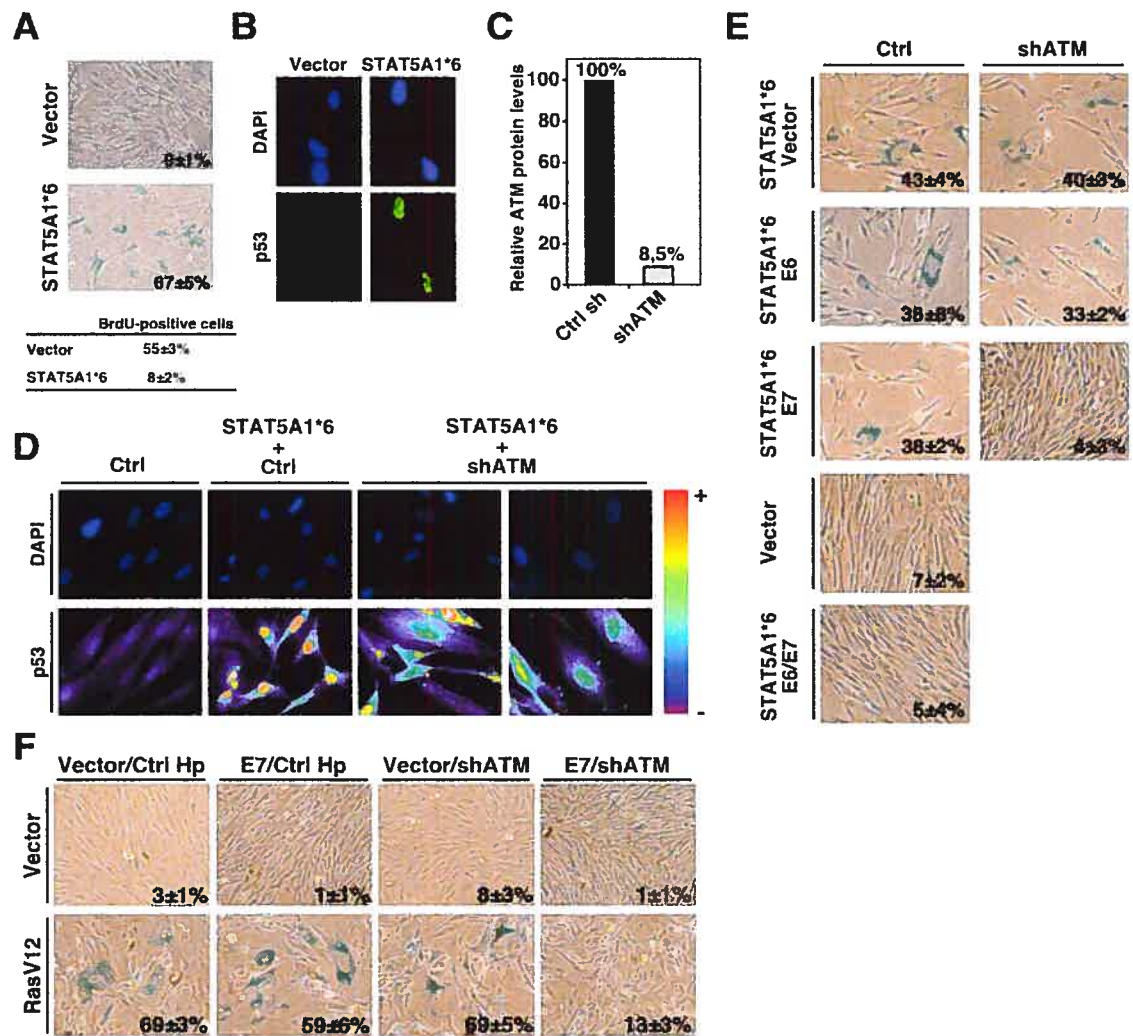
- Wu, C., Miloslavskaya, I., Demontis, S., Maestro, R., and Galaktionov, K. 2004. Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. *Nature* **432**: 640-645.
- Xu, X., Tsvetkov, L.M., and Stern, D.F. 2002. Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization. *Mol Cell Biol* **22**: 4419-4432.
- Ye, X., Franco, A.A., Santos, H., Nelson, D.M., Kaufman, P.D., and Adams, P.D. 2003. Defective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest. *Mol Cell* **11**: 341-351.
- Zhao, H. and Piwnica-Worms, H. 2001. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* **21**: 4129-4139.
- Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* **12**: 2424-2433.
- Zindy, F., Williams, R.T., Baudino, T.A., Rehg, J.E., Skapek, S.X., Cleveland, J.L., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. 2003. Arf tumor suppressor promoter monitors latent oncogenic signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 15930-15935.



## Figures and legends

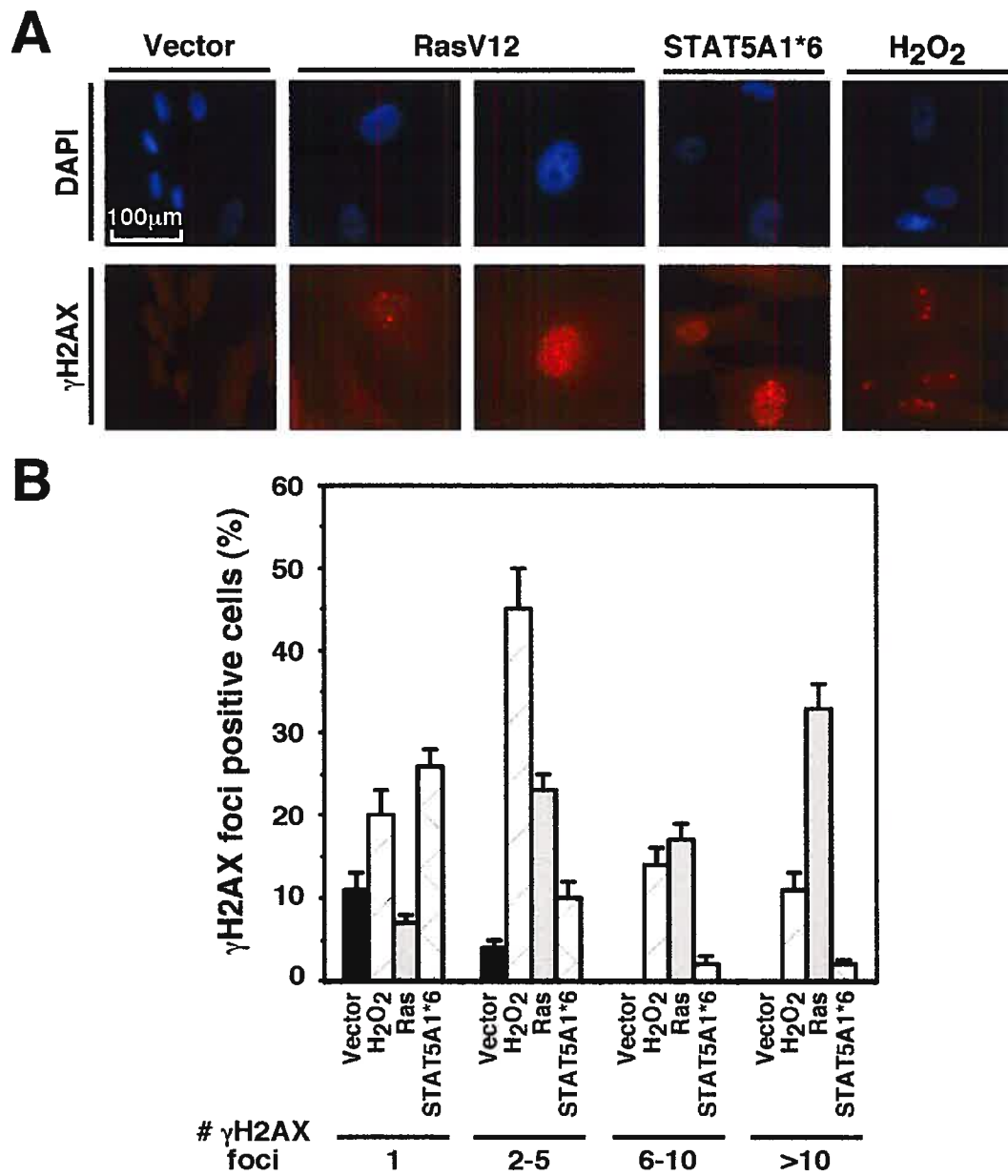
**Figure 1. ATM is critical for oncogene-induced senescence.** **A)** SA- $\beta$ -gal staining of human diploid fibroblasts IMR90 infected with control vector or ca-STAT5A. Percent of SA- $\beta$ -gal positive cells is indicated at the bottom of each panel. Percent of cells that incorporate BrdU is shown below the panels. **B)** Indirect immunofluorescence showing p53 induction by ca-STAT5A in cells fixed eight days after infection. **C)** Quantitation of ATM protein levels in IMR90 infected with a control hairpin or the anti-ATM hairpin vector. **D)** Indirect p53 immunofluorescence in IMR90 cells expressing the indicated vectors. The staining intensity is translated into a color code using the software Metamorph. **E)** Rescue of ca-STAT5A-induced senescence by shRNA against ATM measured by SA- $\beta$ -gal staining. IMR90 cells bearing the empty vector LXS<sub>N</sub> or its derivatives expressing E6 or E7 were infected with an empty vector or its derivative expressing an shRNA against ATM together with STAT5A1\*6. The percent and standard deviation of SA- $\beta$ -gal positive cells is indicated at the bottom right of each panel. Data represents three independent experiments done with cells collected six days post-selection. **F)** Rescue of RasV12-induced senescence by shRNA against ATM measured by SA- $\beta$ -gal staining. Fibroblasts bearing the empty vector LXS<sub>N</sub> or its derivative expressing E7 were infected with an empty vector or its derivative expressing an shRNA against ATM together with RasV12. The percent and standard deviation of SA- $\beta$ -gal positive cells is indicated at the bottom right of each panel. Data represents three independent measurements done with cells fixed 14 days post-selection.

Figure 1



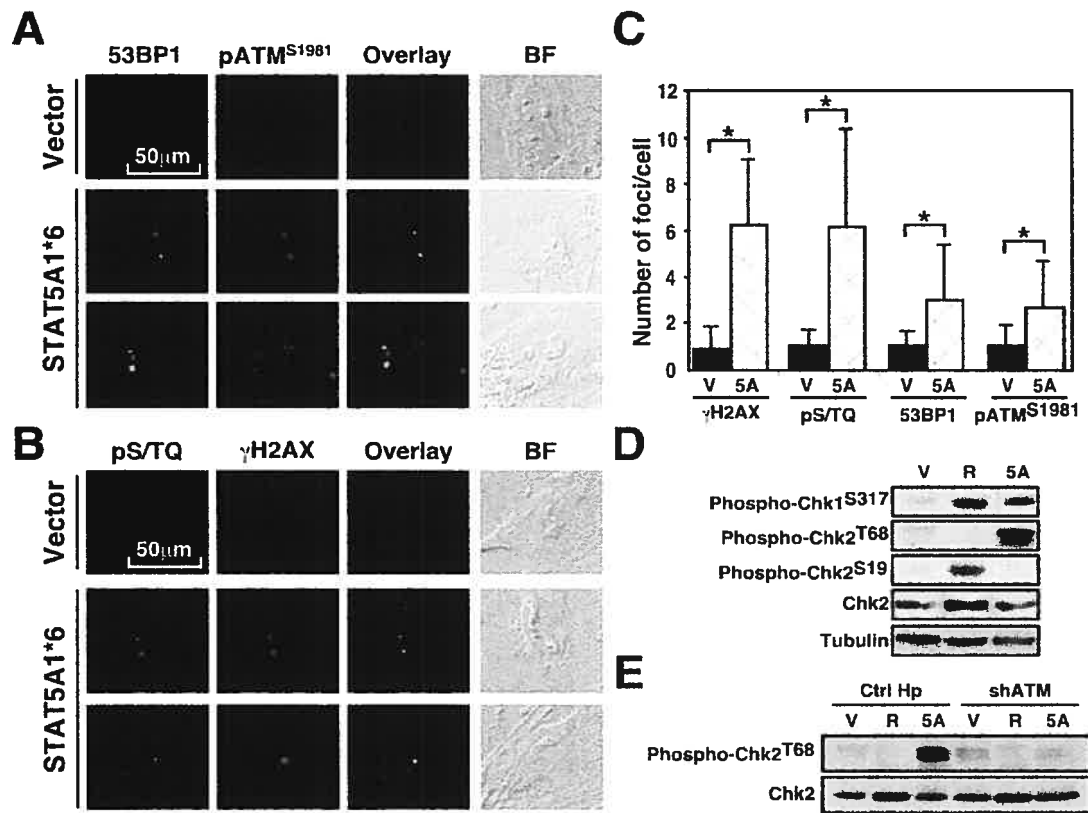
**Figure 2. DNA damage foci in oncogene-induced senescence.** A) Indirect immunofluorescence for  $\gamma$ H2AX foci in cells expressing control vector, RasV12 or STAT5A1\*6. As positive control, cells were treated with hydrogen peroxide. B) Quantitation of the number of  $\gamma$ H2AX foci. Histogram indicates the number of cells containing 1, 2-5, 6-10 and more than 10 foci. The data represents the average and standard deviation of three independent counts of 100 cells each.

Figure 2

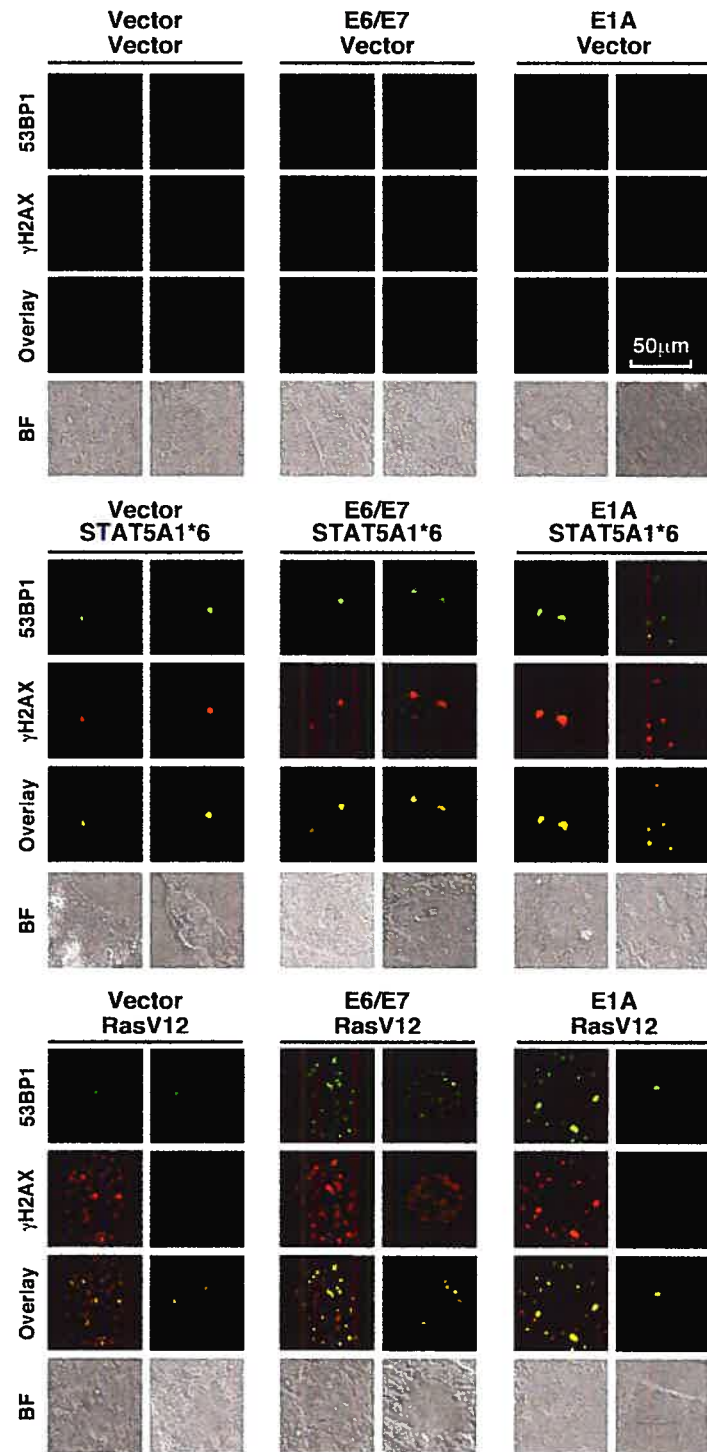


**Figure 3. Characterization of the DNA damage signaling pathway in STAT5A-induced senescence.** **A)** Colocalization 53BP1 foci with phospho-ATM<sup>S1981</sup> in STAT5A1\*6-expressing cells by confocal immunofluorescence. **B)** Colocalization  $\gamma$ H2AX foci with phospho-S/TQ epitopes in STAT5A1\*6-expressing cells by confocal immunofluorescence. **C)** Quantitation of DNA damage foci, asterisk represents a  $p < 0,001$  using the Student's t test. **D)** Immunoblots for Chk1 and Chk2 phosphorylation. **E)** ATM is required for phosphorylation of Chk2 at threonine 68 in ca-STAT5A-induced senescence.

Figure 3



**Figure 4. Oncogene-induced DNA damage foci (ODDI) persist after inactivation of the senescence program.** Confocal immunofluorescence of cells stained with anti-53BP1 and anti- $\gamma$ H2AX. Two nuclei, representative of the cell population are shown.

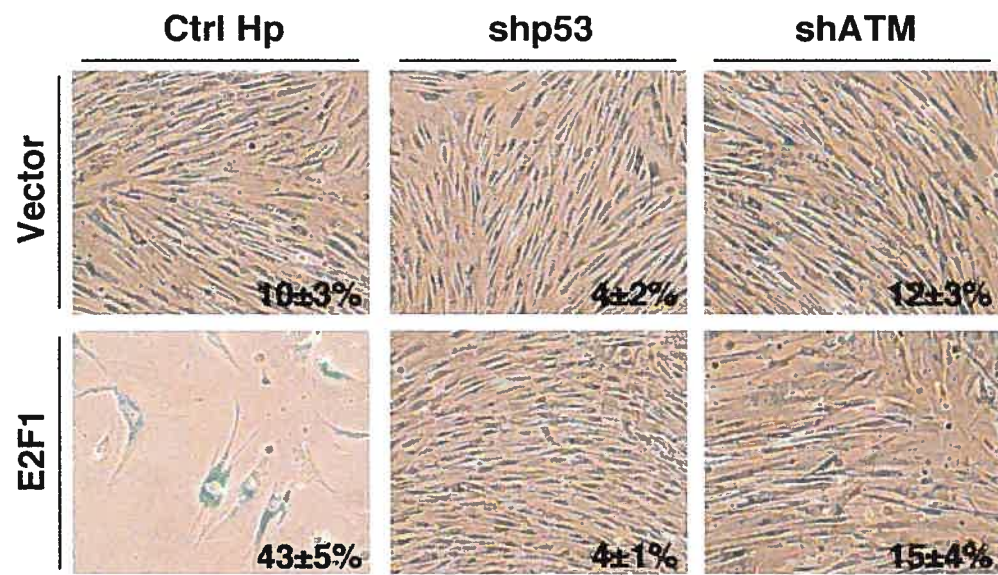
**Figure 4**



## Supplementary figures and legends

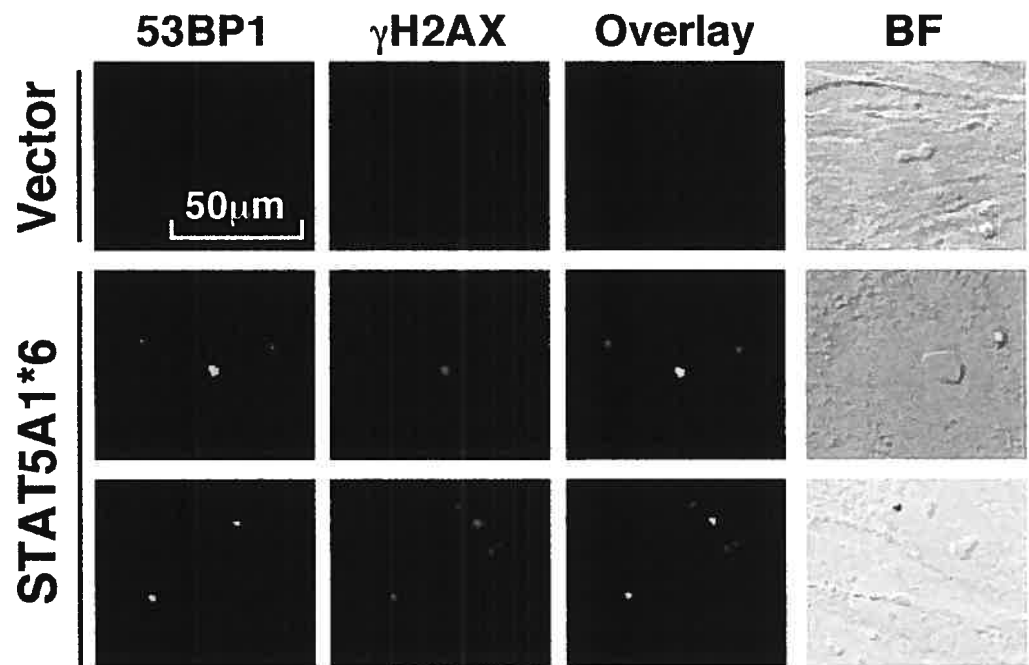
**Supplementary figure 1. E2F1-induced senescence is inhibited by shRNAs against p53 or ATM.** SA- $\beta$ -gal staining of human diploid fibroblasts expressing a control shRNA, an shRNA against p53 (Voorhoeve and Agami 2003) or an shRNA against ATM (Mukhopadhyay et al. 2005) were infected with control vector pBabe or pBabe-E2F-1 (Muller et al. 2001). Percent of SA- $\beta$ -gal positive cells is indicated at the bottom of each panel.

## Supplementary figure 1



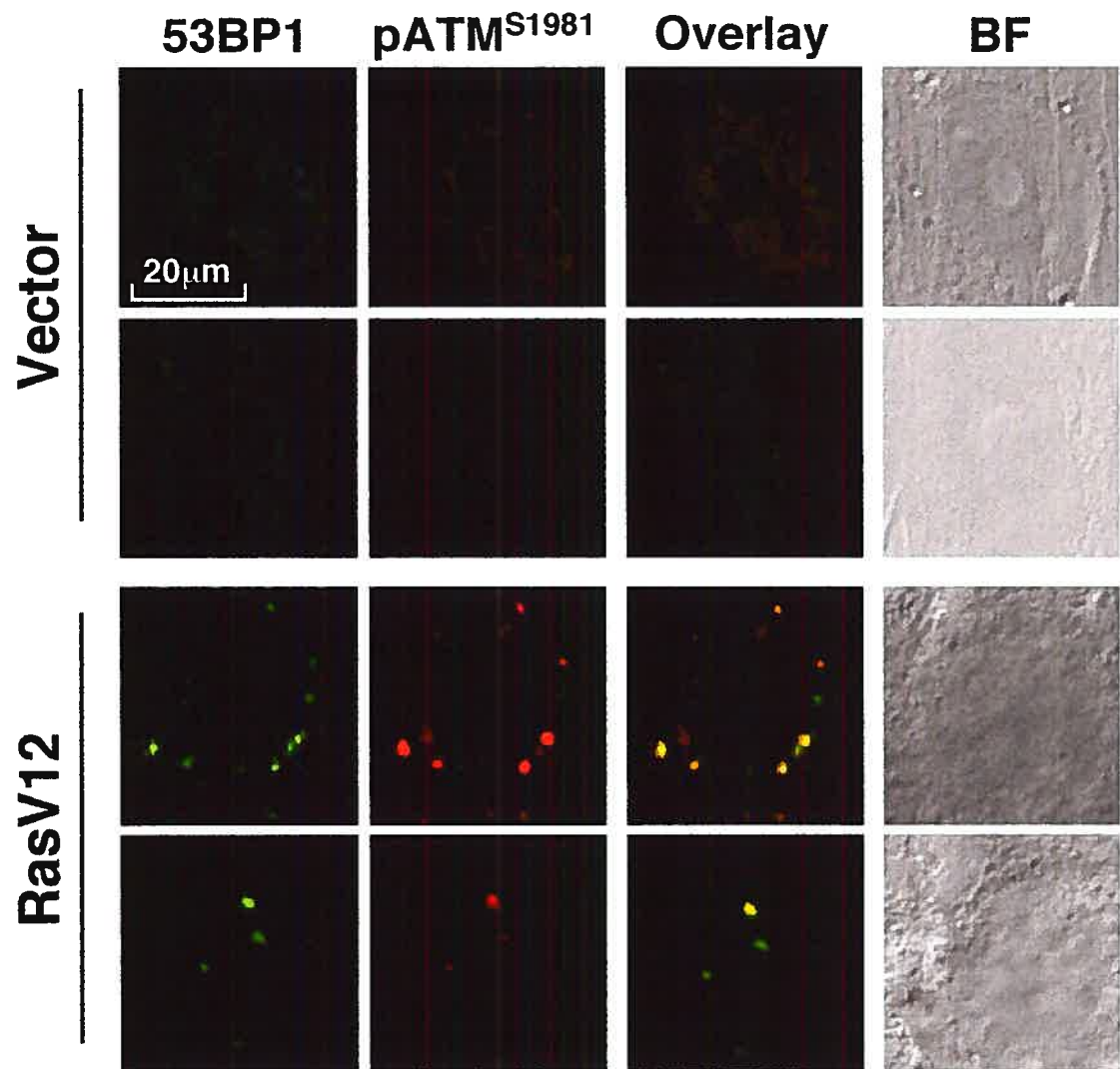
**Supplementary figure 2. Oncogene-induced foci contain 53BP1.** Confocal immunofluorescence to show the colocalization of  $\gamma$ H2AX foci with 53BP1 in IMR90 expressing a control vector or STAT5A1\*6.

Supplementary figure 2



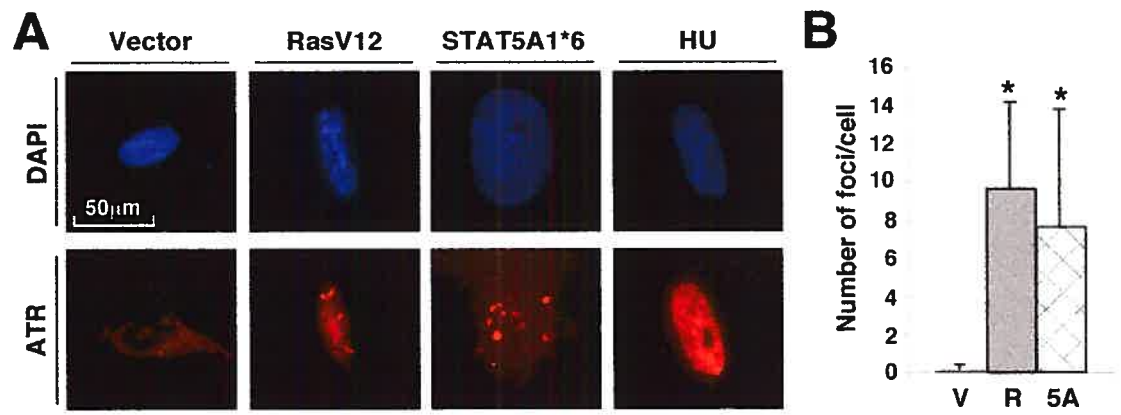
**Supplementary figure 3. Oncogene-induced foci in cells expressing RasV12 contain activated ATM.** Confocal immunofluorescence of cells stained with antibodies against 53BP1 and phospho-ATM<sup>S1981</sup>.

Supplementary figure 3



**Supplementary figure 4. ATR foci in oncogene-induced senescence and hydroxyurea treated cells.** A) Indirect immunofluorescence of cells stained with anti-ATR antibody (N19, 1:50, Santa Cruz). B) Quantitation of ATR foci, asterisks represent a  $p < 0.001$ .

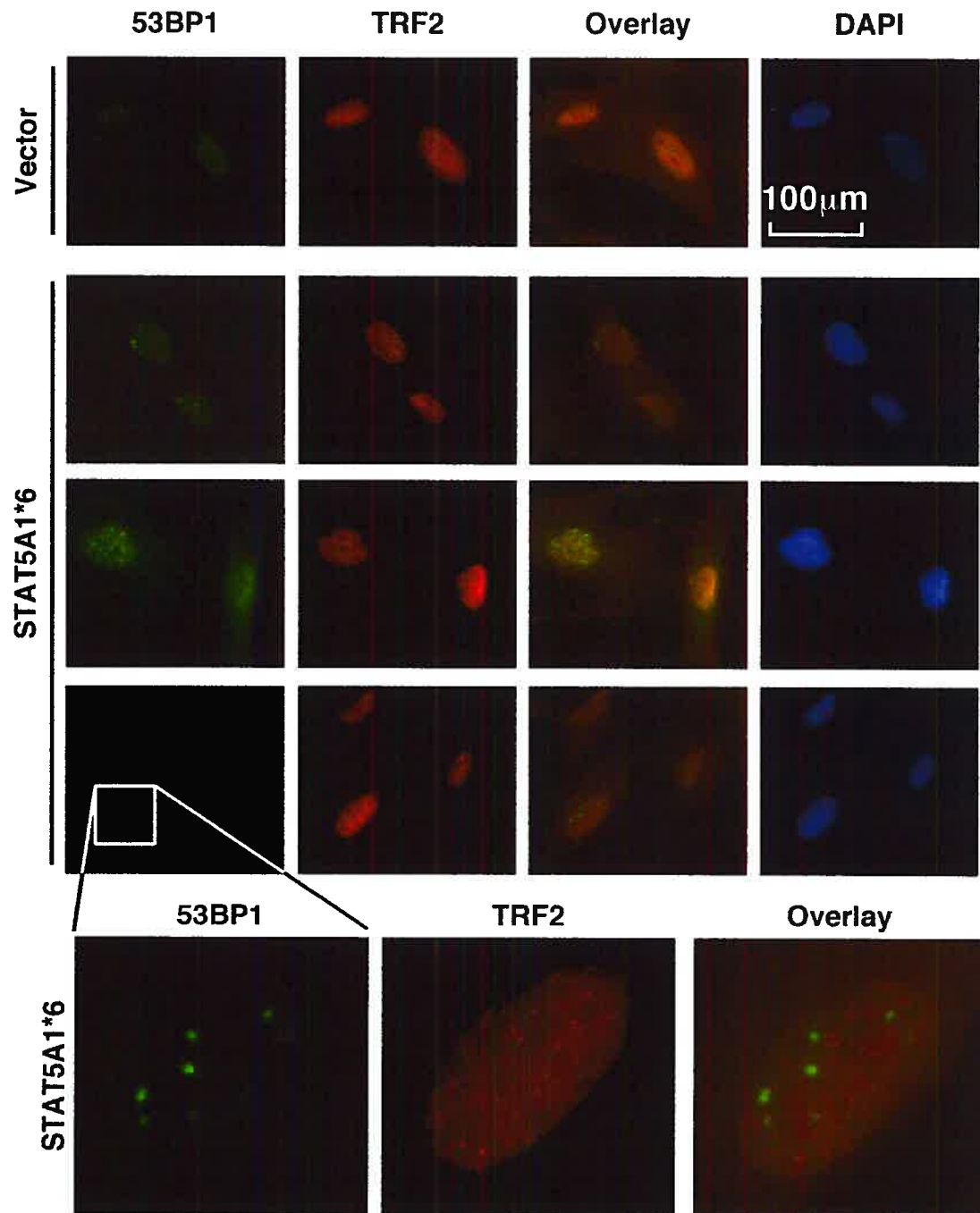
Supplementary figure 4



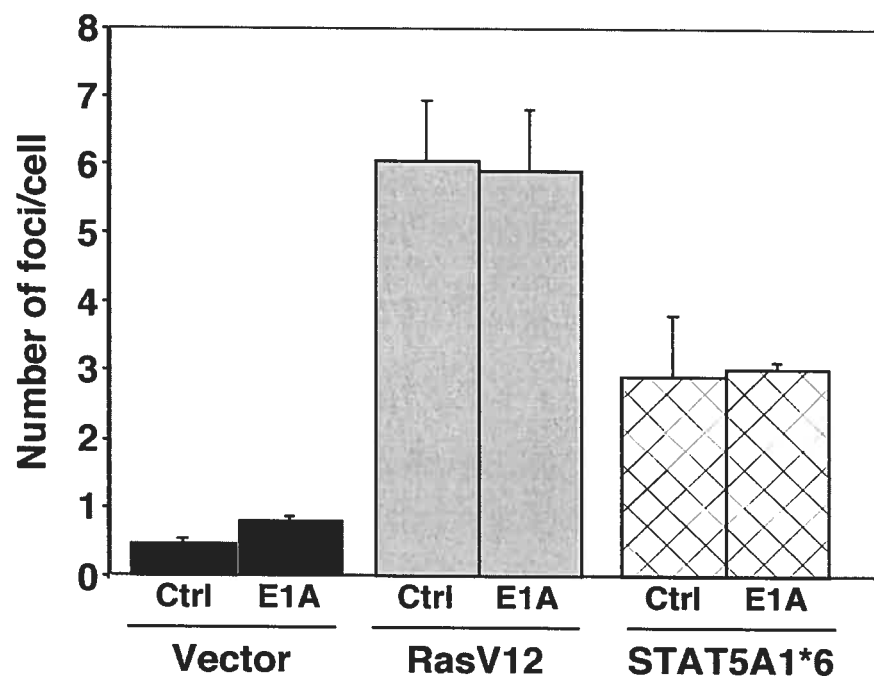


**Supplementary figure 5. Lack of colocalization of  $\gamma$ H2AX foci with the telomeric binding protein TRF2 (Broccoli et al. 1997).** Confocal immunofluorescence of cells stained with anti- $\gamma$ H2AX and anti-TRF2.

Supplementary figure 5



**Supplementary figure 6. Phospho-ATM foci in cells that bypassed senescence.** Cells were stained with antibodies against phospho-ATM<sup>S1981</sup> and the number of foci in 200 cells was quantified after three different counts.

**Supplementary figure 6**

## Supplementary references

- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., and de Lange, T. 1997. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* **17**: 231-235.
- Mukhopadhyay, U.K., Senderowicz, A.M., and Ferbeyre, G. 2005. RNA silencing of checkpoint regulators sensitizes p53-defective prostate cancer cells to chemotherapy while sparing normal cells. *Cancer Res* **65**: 2872-2881.
- Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D., and Helin, K. 2001. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* **15**: 267-285.
- Voorhoeve, P.M. and Agami, R. 2003. The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell* **4**: 311-319.

## **ARTICLE 4: The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence**

### **Mise en contexte**

L'importance de la réponse du dommage à l'ADN lors de la sénescence induite par les oncogènes confère un rôle crucial aux régulateurs de cette voie. En plus de préserver l'intégrité génomique, ATM est également responsable du déclenchement d'un mécanisme essentiel de suppression tumorale.

La présente étude propose différentes hypothèses pouvant expliquer l'accumulation de lésions au niveau de l'ADN. En plus du stress réplicatif, l'expression d'oncogènes mène à la génération d'espèces oxygénées réactives pouvant créer des bris au niveau de l'ADN. Cet article suggère également que la réponse du dommage à l'ADN constitue l'élément commun aux différents types de sénescence dont la sénescence répllicative, liée au dysfonctionnement des télomères, induite par l'expression d'oncogènes ou par différents agents chimiothérapeutiques.

Cet article a été accepté pour publication en 2007 dans la revue *Cell cycle* et doit paraître dans le numéro du 1<sup>er</sup> août 2007 (volume 6, numéro 15).

Note: Contribution(s) des auteurs:

FAM: Culture cellulaire, mesure des espèces oxygénées réactives (ROS) et participation à l'écriture du manuscrit.

GF: Supervision générale et écriture du manuscrit.

# **The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence.**

**Frédéric A. Mallette and Gerardo Ferbeyre.**

Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville,  
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

Keywords: oncogenes, ATM, ROS, p53, senescence.

Correspondence to:

Gerardo Ferbeyre, MD, PhD  
Université de Montréal  
Département de Biochimie, E-515  
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville  
Montréal, Qc H3C 3J7  
Phone 514 343-7571  
Fax 514 343-2210  
Email: [g.ferbeyre@umontreal.ca](mailto:g.ferbeyre@umontreal.ca)

## **Abstract**

The mechanisms of tumor suppression must be linked to the oncogenic threats that may affect a normal cell. An important cancer causing mechanism is the accidental activation of genes that stimulate cell proliferation (oncogenes) by a variety of endogenous or environmental mutagens. This event has been experimentally modelled by enforcing the expression of oncogenes in primary cells. The astonishing outcome of these manipulations is that oncogenes trigger antiproliferative responses preventing progression to malignant transformation. These responses bring to an end proliferation due to cell death or a permanent cell cycle arrest called senescence. Here we review evidence indicating that oncogene induced senescence (OIS) involves activation of p53 via the DNA damage response (DDR). These results imply mechanisms of DNA damage in cells expressing oncogenes, that may be secondary to reactive oxygen species and/or some form of “oncogenic stress” that affect normal DNA replication. Interestingly, DNA damage signals persist in cells that escape from senescence. The implications of these signals for tumorigenesis are also discussed. Given that DNA damage signals have now been observed in cells treated with any stimuli known to induce senescence, the process can be redefined as a metabolically viable but permanent cell cycle arrest with persistent DNA damage signaling.



## **Introduction : oncogenes and tumor suppressors.**

Cancer is a common disease in human and other mammals. However, most individuals succumb to cancer late in their life span <sup>1</sup>. The study of cancer cells revealed that they contain multiple mutations and chromosomal aberrations <sup>2, 3</sup>. It has been rationalized that a long period of time is required for any individual cells to accumulate the right combination of mutations that promote the cancer cell phenotype. Mutations consistently found in cancer cells are selected because they confer a growth advantage by either activating growth promoting pathways, inactivating growth inhibitory pathways or allowing mutations to accumulate <sup>4</sup>. Genes found mutated in human cancers promoting cell growth are known as oncogenes <sup>5</sup>. Oncogenes are altered version of normal genes (proto-oncogenes) and their activation is accidental <sup>4, 5</sup>. Therefore, over the life span any individual may acquire multiple mutations with oncogenic potential, yet only a fraction of individuals experience cancer late in their life span. This fact of life suggests that organisms evolved mechanisms to prevent oncogenic transformation. These mechanisms are controlled by the so called antioncogenes or tumor suppressor genes <sup>6</sup>.

Tumor suppressors may avert cancer by preventing mutations (stability genes), inducing cell death or a program of cell division arrest known as cellular senescence <sup>4, 7</sup>. A key question is: How tumour suppressor proteins recognize an oncogenic threat in the cells? Recent studies, using a variety of oncogenes that induce cellular senescence, identified a common pathway connecting oncogenes to tumour suppressors and the senescence program.

### **Activation of p53 by oncogenes: role of DNA damage.**

The activation of p53 by oncogenes was first observed in studies of oncogene-induced apoptosis and later confirmed in oncogene-induced senescence (OIS) <sup>7</sup>. However, the mechanistic details of the connections remained unknown. The discovery of p19ARF as a p53 activator required for p53 induction by several oncogenes suggested that ARF acted

as a general oncogenic sensor<sup>8-10</sup>. However, ARF is not in reality a sensor in itself because oncogenes regulate ARF at the transcriptional level. It remains to be investigated how the proteins that regulate ARF expression<sup>11</sup> recognize an oncogenic stress. Intriguingly, the ARF locus is located between the tumour suppressors p15INK4b and p16INK4a in human chromosome 9, sharing some sequences with the p16INK4a gene. The three loci are regulated by a replication origin placed 1.5kb upstream of the start codon of p15INK4b. The replication protein Cdc6 binds this origin and promotes the repression of the INK4/ARF locus<sup>12</sup>. It would be interesting to examine whether expression of the INK4/ARF locus in response to oncogenes involves a suppression of this Cdc6-dependent repression mechanism.

It has been puzzling to recognize that ARF is not required for OIS in human cells<sup>13</sup>. Studies from our laboratory and the laboratories of Gorgoulis and D'Adda di Fagagna demonstrated that the DNA damage signaling response (DDR) was required for the activation of p53 in response to a variety of oncogenes, including RasV12, STAT5, E2F1, Mos and Cdc6<sup>14-16</sup>. These papers were in accord in demonstrating that the DDR kinases ATM, ATR, Chk1 and Chk2 were implicated in OIS and their inactivation by RNA interference contributed to bypass OIS. Collectively, these papers argue that oncogenic activity leads to DNA damage, providing a signal to organize an antioncogenic response. Consequently, proteins that acts as oncogenic sensors, could be detecting DNA damage or its immediate effects. Interestingly, the ability of ARF to induce p53 in human osteosarcoma cells was also dependent on the DDR kinases ATR and Chk1<sup>17</sup>. It may well be that both ARF and the DDR are part of an interconnected cellular network to regulate the cellular response to oncogenic threats.

### **DNA damage foci in senescent cells.**

The revealed links between oncogenes and the DDR in normal cells suggest that some form of DNA damage is induced by oncogenes. Several forms of DNA damage can be easily detected in cells as foci that accumulate proteins of the DDR and histone

modifications such as phosphorylation of the histone variant H2AX<sup>18</sup>. These foci were observed in both primary cells expressing oncogenes<sup>14-16</sup> and also in early pre-malignant lesions<sup>19-21</sup>. We named the DNA damage foci found in senescent cells ODDI (Oncogene-induced DNA Damage foci). We think these foci may be unique because they are persistent. Unlike DNA damage foci seen in cells treated with radiation or drugs, ODDI could be resistant to repair. In addition, ODDI are not associated to telomeres<sup>16</sup> and are therefore different from DNA damage foci reported during replicative senescence<sup>22</sup>. In agreement, OIS does not depend on short telomeres because expression of telomerase can not inhibit the process<sup>14, 15, 23</sup>. What is then the cause of formation of ODDI and activation of DDR in oncogene-expressing cells?

### **DNA damage foci and DNA replication stress.**

One intriguing observation is that forcing oncogene-expressing cells to arrest in G1, by serum starvation, prevented the induction of the DDR by Cdc6<sup>15</sup>. Similarly, inhibition of DNA replication with aphidicolin in cells expressing oncogenic *ras* prevented the activation of the DDR<sup>14</sup>. These results could suggest that some sort of replication stress is required to induce the DDR. The DNA damage foci induced by Cdc6 or cyclin E in U2OS osteosarcoma cells or BJ normal fibroblasts colocalized with RPA, a protein that binds single stranded DNA (ssDNA) during DNA replication. However, RPA can also bind to ssDNA during DNA repair in G1<sup>24</sup>. A more direct support for the replication stress model was provided using a technique able to detect replication forks that prematurely arrest or pause their progression<sup>14, 15</sup>. Arrested forks are known to collapse giving rise to double strand breaks that appear as DNA damage foci<sup>25</sup>.

Another kind of replication stress able to induce the DDR is DNA re-replication. This kind of replication stress was detected in Ras-induced senescence using fluorescence in situ hybridization. It was found that OIS cells often contained more than two copies of two chosen loci, indicating re-replication<sup>14</sup>. Previous work showed that replication initiation proteins Cdc6 and Cdt1 along with Cdk2-cyclin A could induce re-replication in

cancer cells but not in normal cells with intact p53<sup>26</sup>. It is not clear why p53 was not able to prevent re-replication during OIS in spite that p53 is clearly active during this process. Loss of Geminin was reported to favour re-replication despite a normal p53 activity<sup>27</sup>. Hence, it would be interesting to investigate whether Geminin functions are compromised during OIS.

One unresolved issue with the replication stress model is that the immediate consequence of a re-replication stress should be an S phase arrest, the triggering of the G2 checkpoint or death in mitosis<sup>27,28</sup>. However, there is no significant cell death during OIS and according to DNA content analysis senescent cells are mainly arrested in G1<sup>29,30</sup>. Currently, there are two plausible explanations for this question. The first possibility is that cells carry replication stress-induced damage through S, G2 and M to arrest in G1. The other possibility is that DNA content analysis is not sensitive enough to detect cells at the G1/S transition when some replication origins already fired.

### **ODDI and transcription.**

All oncogenic activities eventually lead to an increase in transcription of specific genes. Transcription could lead to DNA damage in different ways. Studies in yeast suggest that DNA breaks induced by the transcription machinery can increase recombination<sup>31</sup>. In support of this idea it has been shown that DNA topoisomerase IIb is associated to promoters in mammalian cells where it can generate DNA breaks<sup>32</sup>. These topoisomerase-mediated breaks activate the enzyme poly-ADP ribose polymerase, which induces a replacement of histone H1 by the high mobility group protein (HMG) B1/2. Intriguingly, during Ras-induced senescence the histone H1 is replaced HMGA2 suggesting a mechanism by which DNA breaks can lead to chromatin changes during senescence<sup>33</sup>.

### **ODDI and reactive oxygen species.**

The data supporting a replication stress model do not preclude that other kinds of DNA damaging stresses contribute to OIS. Senescent cells have higher levels of reactive

oxygen species than normal cells growing in the same conditions <sup>34</sup>. In addition growing normal human cells in 1% oxygen prevented Ras-induced senescence and p53 activation <sup>34</sup>. Cells that undergo senescence due to short telomeres also display high levels of ROS <sup>34, 35</sup>. In fact, telomerase can not immortalize all isolates of human diploid fibroblasts when cells are grown in 20% oxygen <sup>36</sup>. These data indicate that replicative senescence is not only driven by the shortening of telomeres, but also by DNA damage induced by ROS. In fact, ROS can directly damage telomeres accelerating their erosion <sup>37</sup>. Taken together, these data suggest that ROS may also contribute to both OIS and replicative senescence.

ROS can be produced by mitochondrial electron transport. However, in Ras-induced senescence, ROS derived from the action of 5-lipoxygenase seem to also play a role <sup>38</sup>. It is commonly assumed that ROS may engage the p53 tumor suppressor pathway by inducing DNA damage. ROS-induced DNA damage includes both single stranded and double stranded DNA breaks. In addition, ROS directly induce oxidative DNA damage and this kind of damage is highly increased in senescent cells <sup>39</sup>. These data indicate that ROS-induced DNA damage may contribute to the senescence phenotype. In support of this model, treatment of primary cells with hydrogen peroxyde induces DNA damage, p53 activity and senescence <sup>40</sup>. However, the relationship between ROS, DNA damage and p53 is more complex. The Myc oncogene can induce ROS accumulation and DNA damage signals. However, at the same time Myc blocks p53 activity permitting DNA replication with DNA damage, which may induce genomic instability <sup>41</sup>. We have detected high levels of ROS in cells expressing oncogenic Ras or constitutively active STAT5A (Figure 1). These oncogenes affect different signaling pathways, suggesting that the ability to induce ROS is a general trait of oncogenic activity.

ROS may play a more complex role in senescence due to their ability to modify protein activity. For example, ROS can activate Seladin, a protein that binds the N-terminus of p53 interfering with binding of Mdm2 and preventing the degradation of p53 <sup>42</sup>. ROS can also activate protein kinase C  $\delta$  (PKC $\delta$ ), which in turn increases ROS production by activating NADPH oxidase, a ROS generating enzyme. These interactions form a positive

feedback loop controlled by p16INK4a. Downregulation of p16INK4a using RNAi blocked senescence, ROS production and activation of PKC $\delta$  in cells with short telomeres <sup>43</sup>. This mechanism seems to be relevant for OIS, because high levels of ROS and PKC $\delta$  were also detected in cells expressing oncogenic *ras* <sup>43</sup>. In addition PKC $\delta$  phosphorylates WARTS leading to its degradation. WARTS is a protein kinase required for cytokinesis. In agreement with a role for PKC $\delta$  in OIS, WARTS levels are low in OIS and OIS is associated with a significant increase in polyploid cells.

ROS levels in cells are a consequence of a balance between ROS production and detoxification mechanisms. p16INK4a increased ROS levels, at least in part, via downregulation of E2F-dependent expression of ROS detoxifying enzymes such as MnSOD <sup>43</sup>. In senescence induced by a constitutive allele of AKT, inhibition of FOXO3a by AKT resulted in accumulation of ROS <sup>44</sup>. FOXO3a is another well-known regulator of MnSOD expression <sup>44</sup>. These data indicates that reducing the normal defence against ROS can have a causal role in senescence. In agreement, direct ablation of SOD by RNA interference induced cellular senescence <sup>45</sup>. Together, the available data support a model where both replication stress and ROS contribute to OIS perhaps converging on the DNA (Figure 2).

### **p53, Rb and the DNA damage response (DDR).**

The role of the DDR in OIS was different in the studies of Bartkova et al. and DiMicco et al., in comparison with the work coming from our laboratory. While Bartkova et al. or DiMicco et al. could bypass OIS by interfering the DDR, we only observed a rescue of OIS by inactivation of the DDR in the context of inactivation of the Rb tumor suppressor pathway. Earlier work on OIS established that in human cells the Rb and the p53 pathways had to be simultaneously inactivated to bypass OIS <sup>29, 30</sup>. This original work was done in the strain of normal fibroblasts IMR90, which are derived from embryonic lungs. In contrast, in BJ foreskin fibroblasts, it has been reported that inactivation of p53 is sufficient to bypass OIS <sup>46</sup>. In agreement, inactivation of the DDR in these cells also

bypassed OIS<sup>14, 15</sup>. One explanation to reconcile these results is that the Rb pathway is not as active in BJ foreskin fibroblasts as in IMR90 cells. Since the p16/Rb pathway controls ROS production<sup>43</sup> it would be interesting if differences in the ability of oncogenes to induce ROS may explain the different results obtained between different isolates of human diploid fibroblasts. In fact, certain isolates of normal human diploid fibroblasts are resistant to Ras-induced senescence and have very low levels of p16INK4a<sup>47</sup>. Again, it would be interesting to study whether oncogenes can induce ROS or the DDR in these cells.

Another characteristic of cellular senescence that has been less well studied is the stability of the phenotype. It has been proposed that senescent cells are stably arrested because genes required for cell proliferation are locked in heterochromatin structures known as SAHF (senescence associated heterochromatin foci)<sup>48</sup>. Intriguingly, SAHF, defined as DAPI-stained nuclear foci, are not present in every form of senescent arrest. BJ fibroblasts exhibit little evidence of SAHF formation in response to oncogenic *ras* and lower expression of p16INK4a in comparison with the embryonic lung fibroblasts IMR90. One idea is that SAHF and p16 control the reversibility of senescence. In agreement, inhibition of p53 could reverse senescence in BJ cells but not in IMR90 cells<sup>49</sup>. The relationship between the DDR, p16INK4a and SAHF remain unexplored, but it is certainly possible that they are all linked<sup>50</sup>.

### **Senescence: a metabolically viable state of persistent DDR.**

The senescent phenotype was originally observed after serial passage of primary cells in culture<sup>51</sup>. Repeated cell division with cell passage leads to telomere erosion, because human somatic cells do not express the enzyme that replenishes telomeres<sup>52</sup>. Short telomeres trigger a local DDR, suggesting that they must look like double strand breaks<sup>22, 53</sup>. Since oncogenes also induce DNA damage signals<sup>14-16</sup> and DNA damaging agents can directly induce senescence<sup>39, 54</sup>, it is applicable to define senescence as a metabolically viable cell cycle arrest with persistent DNA damage signaling.

Senescence cells are known to be metabolically active and are able to secrete a variety of inflammatory mediators<sup>55</sup>. The constitutive activation of the DDR observed in these cells raises questions about how the DDR affect transcriptional programs involved in the stress response, cell differentiation or the response to environmental signals. Cells with constitutive activation of the DDR have been detected in old organisms<sup>56, 57</sup>. It has been proposed that these cells may contribute to aging via its secretion products<sup>58, 59</sup>. OIS provides a convenient cell culture model to study how a persistent DNA damage signal modifies the proteome and transcriptional programs with the potential to interfere with both cell functions and tissue homeostasis.

### **Escape from senescence and DDR.**

The presence of DNA damage foci characterizes both advanced human cancers and pre-malignant lesions<sup>19-21</sup>. Since those tumors must have already found a way around the senescent barrier, we reasoned that bypassing oncogene-induced senescence might not eliminate ODDI. We found that cells that evade senescence, due to expression of viral oncoproteins, proliferate freely in the presence of ODDI<sup>16</sup>. There are three important implications from this result.

First, comes the question of how do cells manage to proliferate in the presence of DNA damage signals. One idea comes from the concept of adaptation proposed by Sandell and Zakian to explain why yeast cells could grow in the presence of DNA damage signals generated by the loss of telomeres<sup>60</sup>. During this process the activity of the kinases Chk1 and Chk2 (Rad53) is actively suppressed<sup>61</sup>. The mechanism depends on yKu70, casein kinase II (CSKB) and the polo like kinase (Cdc5)<sup>61, 62</sup>. The role of the polo like kinase in adaptation has been confirmed in *Xenopus*, indicating that this pathway is conserved from yeast to vertebrates<sup>63</sup>. In mammals, B cells undergo a physiological double strand break that could activate a checkpoint response. In this condition, cells avoid the response via a Bcl6 dependent repression of p53 expression<sup>64</sup>. Intriguingly, Bcl6 has oncogenic activities and is able to bypass Ras-induced senescence<sup>65</sup>. Similar to Bcl6, the Kruppel-like factor 4,



KLF4, represses p53 transcription and inhibits Ras-induced senescence<sup>66</sup>. Together, these studies suggest that multiple molecular mechanisms may contribute to suppress DNA damage signals in tumor cells.

The second implication is that ODDI may still contribute to tumor suppression in cells that evade senescence. In fact, it is known that bypassing senescence is not sufficient to transform primary cells<sup>67-69</sup>. Some results suggest that the G2 checkpoint may offer tumor protection in cells where the G1 checkpoint is inhibited. For example, cells expressing Myc do not arrest in G1, despite having DNA damage signals<sup>41</sup>, however, they do arrest in G2<sup>70</sup>. In addition, a p53-dependent G2 arrest prevented tumorigenesis in cells disabled for the Rb family, which are unable to arrest in G1<sup>71</sup>.

The third implication is that oncogene-induced DNA damage may actually stimulate malignant progression once the senescence barrier and other negative regulators of cell proliferation are disabled. Studies with primary mammary epithelial cells indicated that these cells, in contrast to fibroblasts, can readily escape from senescence accumulating multiple genomic changes that may accelerate tumor progression<sup>72</sup>. Fibroblasts may be more resistant to transformation than epithelial cells, explaining why most cancers affect the latter cell type.

Clearly, the effects of oncogenes, ROS and DNA damage are context dependent. In normal cells they trigger antiproliferative responses but in cells where those responses have been inhibited by genetic or epigenetic mechanisms, they actually accelerate tumor progression and stimulate aberrant cell proliferation. A practical consequence of this concept is that strategies to prevent cancer, by for example increasing DNA damage via ROS, may paradoxically stimulate incipient tumors. On the other hand, blocking ROS production to treat established tumors may help to bypass the senescence response that prevents the early stages of tumorigenesis. Cancer prevention and therapy should evolve to the design of smart devices with the ability of selective targeting

## **Conclusions**

The recognition of DNA damage and DNA damage signals at the very early stages of transformation opens new experimental avenues in cancer research. Cells with a signature of DNA damage may be targeted for cancer prevention. There are also new conceptual implications. Protein involved in DNA damage signaling such as ATM, ATR, Chk1 and Chk2, were considered tumor suppressors because they avoided the accumulation of mutations (caretakers). However, since these proteins are required for the senescence program they also act preventing the expansion of cells bearing oncogenic mutations (gatekeepers). Finally, the presence of DNA damage signals associated in senescent cells and the requirement for the DDR to establish the senescent phenotype justifies to re-define senescence as a special case of cell cycle arrest with chronic DNA damage signaling.

## **Acknowledgements**

We thank S. Nuñez and C. Beausejour for their comments.

## References

1. Carreca I, Balducci L, Extermann M. Cancer in the older person. *Cancer Treat Rev* 2005; 31:380-402.
2. Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, True LD, Loeb LA. Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:18238-42.
3. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396:643-9.
4. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10:789-99.
5. Varmus HE. The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annu Rev Genet* 1984; 18:553-612.
6. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:10914-21.
7. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004; 432:307-15.
8. de Stanchina E, McCurrach ME, Zindy F, Shieh SY, Ferbeyre G, Samuelson AV, Prives C, Roussel MF, Sherr CJ, Lowe SW. E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 1998; 12:2434-42.
9. Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 1998; 12:2424-33.
10. Zindy F, Williams RT, Baudino TA, Rehg JE, Skapek SX, Cleveland JL, Roussel MF, Sherr CJ. Arf tumor suppressor promoter monitors latent oncogenic signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:15930-5.
11. Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:667-77.

12. Gonzalez S, Klatt P, Delgado S, Conde E, Lopez-Rios F, Sanchez-Cespedes M, Mendez J, Antequera F, Serrano M. Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus. *Nature* 2006; 440:702-6.
13. Wei W, Hemmer RM, Sedivy JM. Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2001; 21:6748-57.
14. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG, d'Adda di Fagagna F. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006; 444:638-42.
15. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Orntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 2006; 444:633-7.
16. Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 2007; 21:43-8.
17. Rocha S, Garrett MD, Campbell KJ, Schumm K, Perkins ND. Regulation of NF-kappaB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor. *Embo J* 2005; 24:1157-69.
18. Fernandez-Capetillo O, Celeste A, Nussenzweig A. Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2003; 2:426-7.
19. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, Guldberg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Orntoft T, Lukas J, Bartek J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005; 434:864-70.
20. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Ditullio RA, Jr., Kastrinakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M,

- Kittas C, Halazonetis TD. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005; 434:907-13.
21. DiTullio RA, Jr., Mochan TA, Venere M, Bartkova J, Sehested M, Bartek J, Halazonetis TD. 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat Cell Biol* 2002; 4:998-1002.
22. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003; 426:194-8.
23. Wei S, Wei S, Sedivy JM. Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer Res* 1999; 59:1539-43.
24. Barr SM, Leung CG, Chang EE, Cimprich KA. ATR kinase activity regulates the intranuclear translocation of ATR and RPA following ionizing radiation. *Curr Biol* 2003; 13:1047-51.
25. Osborn AJ, Elledge SJ, Zou L. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* 2002; 12:509-16.
26. Vaziri C, Saxena S, Jeon Y, Lee C, Murata K, Machida Y, Wagle N, Hwang DS, Dutta A. A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication. *Mol Cell* 2003; 11:997-1008.
27. Melixetian M, Ballabeni A, Masiero L, Gasparini P, Zamponi R, Bartek J, Lukas J, Helin K. Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53. *J Cell Biol* 2004; 165:473-82.
28. Zhu W, Chen Y, Dutta A. Rereplication by depletion of geminin is seen regardless of p53 status and activates a G2/M checkpoint. *Mol Cell Biol* 2004; 24:7140-50.
29. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88:593-602.

30. Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 2000; 14:2015-27.
31. Gonzalez-Barrera S, Garcia-Rubio M, Aguilera A. Transcription and double-strand breaks induce similar mitotic recombination events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2002; 162:603-14.
32. Ju BG, Lunyak VV, Perissi V, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG. A topoisomerase II $\beta$ -mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* 2006; 312:1798-802.
33. Funayama R, Saito M, Tanobe H, Ishikawa F. Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol* 2006; 175:869-80.
34. Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, Yu ZX, Ferrans VJ, Howard BH, Finkel T. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1999; 274:7936-40.
35. Hutter E, Unterluggauer H, Uberall F, Schramek H, Jansen-Durr P. Replicative senescence of human fibroblasts: the role of Ras-dependent signaling and oxidative stress. *Exp Gerontol* 2002; 37:1165-74.
36. Forsyth NR, Evans AP, Shay JW, Wright WE. Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase. *Aging Cell* 2003; 2:235-43.
37. von Zglinicki T, Pilger R, Sitte N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:64-74.
38. Catalano A, Rodilossi S, Caprari P, Coppola V, Procopio A. 5-Lipoxygenase regulates senescence-like growth arrest by promoting ROS-dependent p53 activation. *EMBO J* 2005; 24:170-9.
39. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:4337-41.

40. Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, Ames BN. Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J* 1998; 332:43-50.
41. Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, Wahl GM. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* 2002; 9:1031-44.
42. Wu C, Miloslavskaya I, Demontis S, Maestro R, Galaktionov K. Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. *Nature* 2004; 432:640-5.
43. Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, Iida S, Tahara H, Nakayama K, Nakayama KI, Ide T, Saya H, Hara E. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol* 2006; 8:1291-7.
44. Miyauchi H, Minamino T, Tateno K, Kunieda T, Toko H, Komuro I. Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *Embo J* 2004; 23:212-20.
45. Blander G, de Oliveira RM, Conboy CM, Haigis M, Guarente L. Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem* 2003; 278:38966-9.
46. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, Nojima H, Looijenga LH, Agami R. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 2006; 124:1169-81.
47. Benanti JA, Galloway DA. Normal human fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *Mol Cell Biol* 2004; 24:2842-52.
48. Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003; 113:703-16.

49. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* 2003; 22:4212-22.
50. Hemann MT, Narita M. Oncogenes and senescence: breaking down in the fast lane. *Genes Dev* 2007; 21:1-5.
51. Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37:614-36.
52. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279:349-52.
53. Gire V, Roux P, Wynford-Thomas D, Brondello JM, Dulic V. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *Embo J* 2004; 23:2554-63.
54. Linke SP, Clarkin KC, Wahl GM. p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation. *Cancer Res* 1997; 57:1171-9.
55. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 2005; 120:513-22.
56. Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 2004; 6:168-70.
57. Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. Cellular senescence in aging primates. *Science* 2006; 311:1257.
58. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:12072-7.
59. Ferbeyre G, Lowe SW. The price of tumour suppression? *Nature* 2002; 415:26-7.
60. Sandell LL, Zakian VA. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* 1993; 75:729-39.

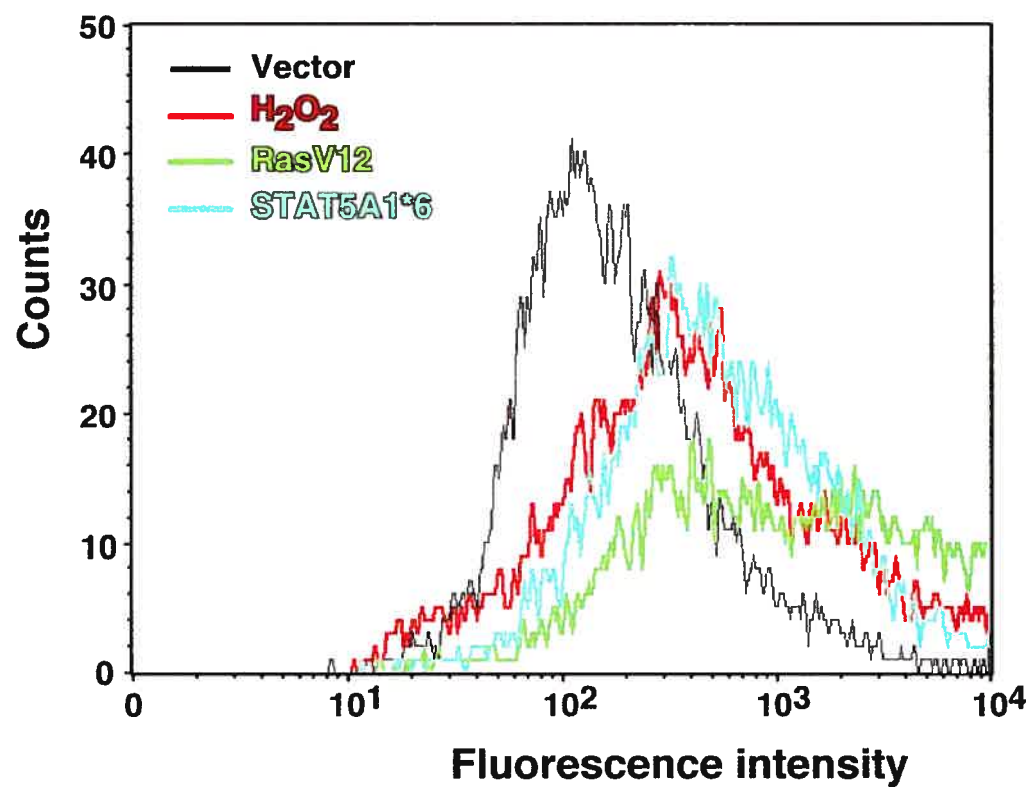


61. Pellicioli A, Lee SE, Lucca C, Foiani M, Haber JE. Regulation of *Saccharomyces* Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest. *Mol Cell* 2001; 7:293-300.
62. Toczyski DP, Galgoczy DJ, Hartwell LH. CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* 1997; 90:1097-106.
63. Yoo HY, Kumagai A, Shevchenko A, Shevchenko A, Dunphy WG. Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. *Cell* 2004; 117:575-88.
64. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 2004; 432:635-9.
65. Shvarts A, Brummelkamp TR, Scheeren F, Koh E, Daley GQ, Spits H, Bernards R. A senescence rescue screen identifies BCL6 as an inhibitor of anti-proliferative p19(ARF)-p53 signaling. *Genes Dev* 2002; 16:681-6.
66. Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol* 2005; 7:1074-82.
67. Morales CP, Holt SE, Ouellette M, Kaur KJ, Yan Y, Wilson KS, White MA, Wright WE, Shay JW. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* 1999; 21:115-8.
68. Dannenberg JH, van Rossum A, Schuijff L, te Riele H. Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev* 2000; 14:3051-64.
69. Peeper DS, Dannenberg JH, Douma S, te Riele H, Bernards R. Escape from premature senescence is not sufficient for oncogenic transformation by Ras. *Nat Cell Biol* 2001; 3:198-203.
70. Felsher DW, Zetterberg A, Zhu J, Tlsty T, Bishop JM. Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:10544-8.

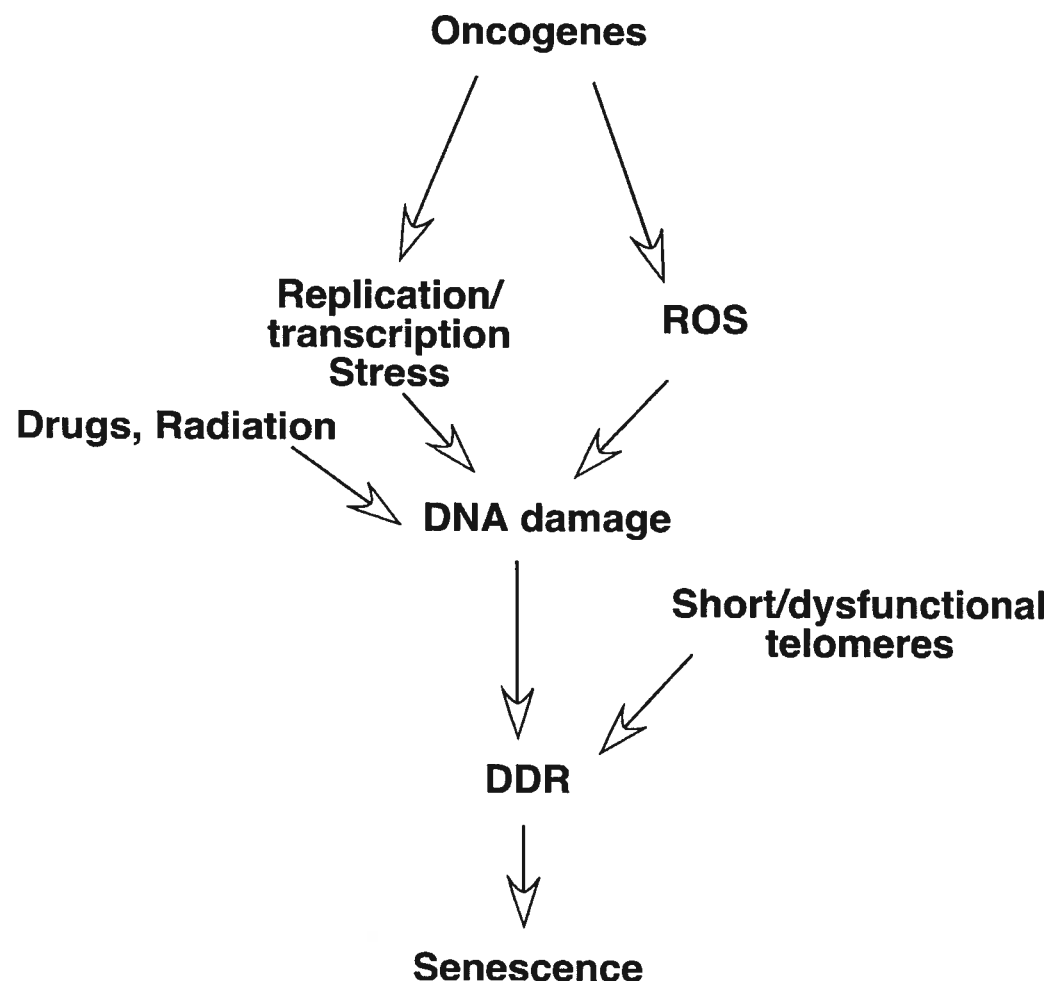
71. Foijer F, Wolthuis RM, Doodeman V, Medema RH, te Riele H. Mitogen requirement for cell cycle progression in the absence of pocket protein activity. *Cancer Cell* 2005; 8:455-66.
72. Romanov SR, Kozakiewicz BK, Holst CR, Stampfer MR, Haupt LM, Tlsty TD. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* 2001; 409:633-7.
73. Moiseeva O, Mallette FA, Mukhopadhyay UK, Moores A, Ferbeyre G. DNA Damage Signaling and p53-dependent Senescence after Prolonged beta-Interferon Stimulation. *Mol Biol Cell* 2006; 17:1583-92.

## Figures and legends

**Figure 1. Accumulation of ROS in cells expressing two different oncogenes that induce senescence: RasV12 and ca-STAT5A.** The levels of ROS are similar to those found in cells treated with a 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Senescence was induced as described in <sup>16</sup> and ROS were measured by FACS using the fluorescence probe H2DCFDA from Molecular Probes as described in <sup>73</sup>.

**Figure 1**

**Figure 2. Senescence is a general response to DNA damage signals.** Oncogenes may induce DNA damage by forcing an aberrant DNA replication process where some replication forks arrest as a result of some yet unknown mechanisms. Another possibility is that oncogenes induce the accumulation of ROS, which are known for their reactivity and ability to produce oxidative base damage and DNA breaks.

**Figure 2**

## **DISCUSSION**

La prolifération cellulaire est sujette à un contrôle rigoureux car la prolifération excessive mène à la formation de cancers. Afin d'empêcher la transformation, les cellules ont mis en place plusieurs mécanismes permettant la détection du stress oncogénique puis l'établissement de programmes de suppression tumorale. Les articles présentés dans cette thèse suggèrent que la sénescence cellulaire est induite par un réseau complexe de suppresseurs tumoraux.

### **Le régulateur de la sénescence PML**

#### **PML et le suppresseur tumoral Rb**

Le premier article constituant cette thèse démontre que les oncoprotéines virales E6 et E7 abolissent la sénescence induite par PML dans les cellules humaines, suggérant l'importance des voies de suppression tumorale de p53 et Rb. L'avantage de l'utilisation de E6 et E7 réside dans la possibilité de les exprimer séparément afin de dissocier l'importance relative des voies de p53 et Rb. Or, l'expression de E7, et non de E6 ou d'un dominant négatif de p53, est suffisante à l'inhibition de la sénescence induite par PML chez les cellules humaines. Depuis, le contournement de la sénescence induite par PML grâce à E7 fut confirmé par un autre groupe de recherche [605]. Cette observation permet donc de croire que la voie de Rb est prédominante lors du programme de sénescence déclenché par PML. De plus, plusieurs études ont également démontré que la protéine p53 n'est pas essentielle à différents types de sénescence déclenchés chez l'humain dont la sénescence induite par Ras [96], suite à la déprotection des télomères [62] et même par STAT5 [606].

Un inconvénient surgit toutefois suite à l'utilisation de l'oncoprotéine virale E7. Celle-ci semble interférer avec une multitude de protéines cellulaires. Parmi les plus importantes, on compte d'ailleurs p21 [607, 608]. De plus, depuis la parution de l'article 1, il a été démontré que E7 peut lier PML ainsi que diminuer l'affinité de p53 pour l'acétyltransférase CBP [605]. L'utilisation de shRNAs représente une meilleure stratégie

afin d'étudier les voies de suppression tumorale lors de la sénescence induite par PML. Cette approche aurait cependant rendu difficile l'inactivation des trois membres de la famille de Rb, ce que permettait E7.

### **Sénescence induite par PML et cancer du col de l'utérus**

L'infection par le virus du papillome humain (VPH) constitue une des causes principales du cancer du col de l'utérus [609]. Les protéines E6 et E7 pourraient jouer un rôle important dans la formation de cancers en permettant de contourner la sénescence induite par PML. En fait, l'inhibition des protéines E6 et E7 dans les lignées provenant de cancers du col de l'utérus restaure les fonctions de p53 et Rb puis déclenche le programme de sénescence [610, 611]. De plus, la capacité de PML de former des PML-NBs est sévèrement compromise par l'expression de E6 et E7 ce qui permet de croire qu'en plus de bloquer l'activité de p53 et Rb, ces deux protéines virales inhibent l'activité de PML [417]. Puisque notre étude s'est limitée à l'analyse de l'impact des protéines E6 et E7 du VPH de type 16 associé à un risque élevé de formation de cancers, il serait pertinent d'évaluer l'impact de E6 et E7 provenant de VPH associés à des risques de cancer modérés et faibles sur la formation des PML-NBs et la sénescence par PML.

### **La voie de p53 lors de la sénescence induite par PML**

Il est alors crucial de ne pas sous-estimer le rôle de p53 lors de la sénescence par PML. Bien que la sénescence provoquée par PML dépende majoritairement de Rb, la voie de p53 semble également contribuer au phénotype. En fait, l'expression de E6 non seulement retarde l'arrêt de croissance causé par PML, mais bloque aussi partiellement l'entrée en sénescence [417]. Le contournement de la sénescence obtenu par l'expression de E7 ne permet pas d'éliminer la possibilité que p53 contribue à l'activation de la voie de Rb. Par exemple, l'expression de PML mène à l'augmentation de l'activité



transcriptionnelle de p53 causant ainsi l'accumulation de p21. Il est alors probable que p21 participe à la stimulation de la voie de Rb afin de déclencher la sénescence, ce qui pourrait expliquer la diminution de cellules sénescents observées lors de l'expression de E6.

### **Les voies de suppression tumorale sont reliées différemment chez l'humain et la souris lors de la sénescence induite par PML**

Nos résultats, ainsi que des études menées par différents groupes indépendants, confirment également que les mécanismes de suppression tumorale ne sont pas reliés de la même façon chez la souris et l'humain. Bien que cette notion est maintenant plus largement acceptée, elle suscitait de nombreuses interrogations il y a quelques années. Chez l'humain, PML semble dépendre majoritairement de la voie de Rb [417, 457, 605]. Toutefois, chez la souris, c'est la voie de p53 qui semble être nécessaire puisque l'absence de p53 ou l'expression de SIRT1, déacétylase ciblant p53, permet le contournement de l'arrêt de prolifération causé par PML [165, 466].

### **E6 et E7 permettent d'établir une comparaison des phénotypes de sénescence déclenchés par différents stimuli**

Grâce aux oncoprotéines E6 et E7, il est également possible d'établir une hiérarchie de la stabilité du phénotype de sénescence déclenché par PML, Ras et STAT5 chez les cellules humaines. Bien que l'oncoprotéine E7 soit suffisante pour contourner la sénescence par PML, seule l'expression simultanée de E6 et E7 permet d'échapper à la sénescence déclenchée par STAT5 (article 2). Puisque STAT5 se situe en amont de PML, il est logique qu'il puisse stimuler un programme de suppression tumorale plus important menant à l'activation de voies de p53 et Rb. Finalement, la sénescence causée par l'expression de l'oncogène Ras semble présenter le phénotype le plus stable puisqu'il n'est que partiellement bloqué par l'expression de E6 et E7 [417].

## Mécanisme d'activation de Rb par PML

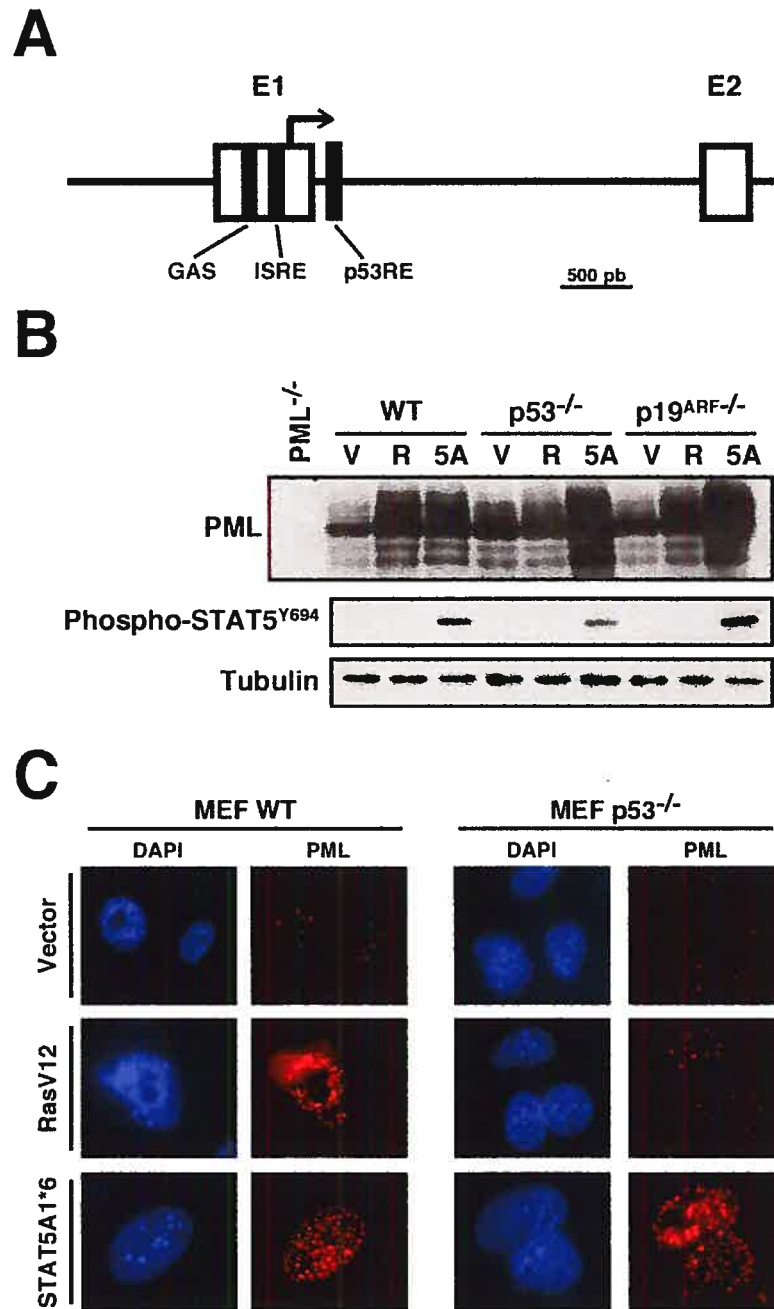
Certaines questions importantes demeurent cependant sans réponse. Le mécanisme précis par lequel PML active la voie de Rb doit toujours être élucidé. Plusieurs mécanismes peuvent toutefois être proposés. Tout d'abord, PML et les PML-NBs pourraient représenter un lieu d'activation ou de protection de Rb contre la phosphorylation des CDKs. Puisque Rb localise aux PML-NBs [418], ces derniers permettraient l'activation de Rb en recrutant des phosphatases activant Rb, comme PP2A [612]. D'ailleurs, PP2A localise aux PML-NBs [391] où il pourrait localement déphosphoryler Rb afin de le maintenir dans un état permettant la répression de E2F. PML peut également interagir avec Myc et causer sa dégradation [421, 422, 613]. La déstabilisation et la liaison de Myc semble spécifique à PML-IV [613], seul isoforme de PML causant le phénotype de sénescence [465]. La surexpression de PML cause la dégradation de Myc et permet l'induction des gènes réprimés par Myc [421, 613]. Parmi ces gènes on retrouve l'inhibiteur de CDK4, p15<sup>INK4b</sup> [614]. Cette augmentation de p15<sup>INK4b</sup> pourrait alors constituer le mécanisme d'activation de la voie de Rb. Un autre scénario possible implique la diminution des niveaux de cycline D par PML. PML bloque le transport de l'ARNm de cycline D au cytoplasme causant ainsi une diminution des niveaux de la protéine [377, 424]. Cette diminution de cycline D pourrait expliquer la réduction de la phosphorylation de Rb et son maintien dans son état actif de répression.

Les différents modèles proposés afin d'expliquer l'activation de Rb par PML ne sont pas exclusifs. Le processus utilisé par PML pour activer la voie de Rb pourrait donc engager ces différents mécanismes simultanément.

## Régulation de PML durant la sénescence induite par les oncogènes Ras et STAT5

Le suppresseur tumoral PML participe à la réponse de sénescence induite suite à l'expression de l'oncogène Ras [90, 165]. L'activation de Ras dans les cellules normales conduit à l'activation de p53 et PML participe à cette activation en recrutant p53 et CBP au PML-NBs [90, 165]. Mais PML est également une cible transcriptionnelle de p53 et contribue à l'effet anti-prolifératif de p53 [248]. Le promoteur de *PML* humain contient un élément de réponse à p53 fonctionnel tandis que l'on en retrouve trois sur le promoteur de *PML* de la souris [248] (Figure 1A). Dans les cellules normales, l'expression des oncogènes Ras et STAT5 mène à l'activation de p53 et à l'induction des niveaux de PML (Figure 1B et C). Toutefois, l'augmentation des niveaux de PML lors de la sénescence induite par Ras dépend de la voie de p53 tel que démontré par l'utilisation de MEFs n'exprimant pas p53 ou p19<sup>ARF</sup>. La régulation de PML par STAT5 est cependant bien différente. En absence de p53 ou p19<sup>ARF</sup>, STAT5 provoque toujours l'accumulation de PML (Figure 1B et C). Il a déjà été démontré que la voie des STATs, suite à la stimulation par l'interféron, régule les niveaux de PML [438, 440, 441]. Cette faculté de STAT5 d'activer l'expression de PML en absence de p53 provient de la présence de deux éléments de réponse aux STATs fonctionnels [438] (Figure 1A). Cette capacité des STATs d'activer le suppresseur tumoral PML en absence de p53, confère un avantage important à la sénescence induite par STAT5 au niveau de la stabilité du phénotype de sénescence. L'utilisation d'un réseau de voies parallèles, comme celles de p53 et des STATs, afin de relier les suppresseurs tumoraux assure l'établissement de la sénescence en cas d'inactivation accidentelle d'une des voies engagées.

**Figure 1. Régulation de l'expression de PML lors des sénescences induites par les oncogènes Ras et STAT5.** **A)** Représentation schématique du promoteur de *PML* humain. Les deux premiers exons (E1 et E2), le site de début de la traduction (flèche) ainsi que les éléments de réponse aux STATs (ISRE et GAS) et à p53 (p53RE). **B)** Immunobuvardage montrant l'expression de PML lors de la sénescence induite par Ras ou STAT5 dans les MEFs de type sauvage, p53<sup>-/-</sup> ou p19<sup>ARF</sup><sup>-/-</sup> (données obtenues par Botum Mao, F.A.M. et G.F.). **C)** Immunofluorescence indirecte contre PML dans les MEFs de type sauvage ou p53<sup>-/-</sup> infectés avec un vecteur contrôle, Ras ou STAT5 (données obtenues par F.A.M. et G.F.). Pour une description de la méthode voir [417].

**Figure 1**

## La sénescence induite par STAT5 : un nouveau modèle

### STAT5, Myc et sénescence

La progression du cycle cellulaire dépend de kinases hétérodimériques formées d'une sous-unité régulatrice, nommée cycline, ainsi que d'une sous-unité catalytique ou CDK. CDK4 et CDK6 sont les kinases permettant la transition G1/S lorsque associées à la cycline D. Ces complexes vont par la suite phosphoryler les protéines membres de la famille du rétinoblastome Rb, p107 et p130.

Lors de la sénescence induite par Ras, les niveaux de CDK4 diminuent, mais de façon transitoire [14]. Puisque les niveaux de p16<sup>INK4a</sup> augmentent plus tardivement, cette diminution transitoire de CDK4 permettrait d'arrêter la progression du cycle cellulaire, fonction par la suite prise en charge par p16<sup>INK4a</sup>. Cependant, l'activation de la voie de Rb lors de la sénescence induite par STAT5 semble plutôt le résultat de la diminution des niveaux de CDK4 puisque ceux de p16<sup>INK4a</sup> ne varient pas. Cette réduction de CDK4 participe à l'activation de la voie de Rb lors de la sénescence déclenchée par l'expression de STAT5.

Toutefois, certaines évidences suggèrent que ni CDK4, ni CDK6 ne sont requises à la prolifération normale des cellules [615-617]. En absence de CDK4, les cellules prolifèrent normalement, mais exhibent un délai lors de l'entrée en phase S [615]. Cependant, la délétion de CDK4 dans un contexte oncogénique, comme l'expression de Ras en absence de p53, cause un arrêt de la prolifération [618]. La transformation de cellules épithéliales mammaires par ErbB-2 nécessite également CDK4 [619]. De plus, la perte de CDK4 chez les MEFs *INK4a/ARF*<sup>-/-</sup> induit le phénotype de sénescence chez ces cellules normalement immortelles [618]. Bien que CDK4 ne soit pas nécessaire à la progression du cycle cellulaire, sa diminution contribue à l'acquisition du phénotype de sénescence suite à une stimulation oncogénique. Ces données suggèrent un rôle différent joué par CDK4 lors de la prolifération normale des cellules et la transformation cellulaire.

La diminution de l'activité transcriptionnelle de Myc causée par sa dégradation pourrait représenter un mécanisme général permettant d'engager la voie de Rb et la sénescence. D'ailleurs, la diminution de l'activité de la voie de Myc permet l'entrée en sénescence [268]. La réduction de Myc cause la diminution de la transcription de Bmi-1, régulateur du locus *INK4a/ARF*, menant ainsi à l'augmentation de p16<sup>INK4a</sup> [268]. L'activation constitutive de STAT5 déclenche la dégradation de Myc afin de diminuer les niveaux CDK4 sans cependant causer une augmentation de p16<sup>INK4a</sup>. Cette observation peut être expliquée par le fait que CITED2, un régulateur transcriptionnel positif de Bmi-1 [301], est fortement augmenté lors de la sénescence induite par STAT5 (Tableau I).

Myc ne représente pas l'unique régulateur des niveaux de CDK4. La cytokine TGF- $\beta$  contrôle également la synthèse de CDK4 par l'inhibition de sa traduction par un mécanisme dépendant de p53 [620, 621]. D'ailleurs, TGF- $\beta$  s'oppose à la transcription régulée par Myc en bloquant son recrutement sur certains promoteurs, dont celui de p15<sup>INK4b</sup> [271]. Un tel mécanisme pourrait également participer à la réduction des niveaux de CDK4 lors de la sénescence induite par STAT5. La stimulation par TGF- $\beta$  contribue au phénotype de sénescence causé par le stress oxydatif [622]. Le stress oxydatif observé lors de la sénescence induite par STAT5 pourrait mener à l'activation de la voie de TGF- $\beta$  tel qu'il fut précédemment démontré [622]. Toutefois, l'activation de la voie de TGF- $\beta$  lors de la sénescence par STAT5 n'est que spéculation et doit être étudiée plus en profondeur.

La régulation de la traduction de CDK4 par TGF- $\beta$  dépend de p53 [621]. Le rôle de p53 dans la diminution des niveaux de CDK4 lors de la sénescence induite par STAT5 doit alors être élucidé. De plus, il fut récemment démontré que p53 stimule un programme de suppression tumorale impliquant certains miRNAs dont miR-34. Or, l'expression de miR-34 dans les cellules cause une diminution importante de CDK4. Un tel programme dépendant de miRNAs pourrait expliquer ou du moins contribuer à la réduction des niveaux de CDK4 lors de la sénescence induite par STAT5 [230].

Bien que les niveaux d'ARNm de CDK4 diminuent lors de la sénescence induite par STAT5, la possibilité qu'un mécanisme de dégradation protéique contribue à la diminution de CDK4 déclenchée par STAT5 ne peut être exclue. L'inhibition du protéasome, grâce au MG-132 par exemple, permettrait d'évaluer l'impact d'un tel mécanisme lors de la sénescence induite par STAT5. Advenant la présence d'un tel mécanisme de dégradation protéique de CDK4, il serait pertinent d'en étudier le fonctionnement en examinant par exemple l'ubiquitination de la protéine ainsi que ses différentes modifications post-traductionnelles menant à sa dégradation.

## **La réponse de dommage à l'ADN : Senseur du stress oncogénique**

### **La sénescence induite par les oncogènes et la réponse de dommage à l'ADN**

L'activation et l'expression d'oncogènes constitue un événement important menant à la transformation, mais la sénescence permet de contrer la formation de tumeurs. L'étude chez la souris du mécanisme d'activation de p53 par différents oncogènes suggère que ARF agit comme senseur général du stress oncogénique [270, 274]. Toutefois, chez l'humain ARF n'est pas requis lors de la sénescence induite par les oncogène. Or, la nature du senseur du stress oncogénique permettant d'engager la voie de p53 demeurerait inconnu chez les cellules humaines. L'article 3 démontre que la réponse de dommage à l'ADN est cruciale à l'activation de p53 et à la sénescence chez les cellules humaines. Cette étude révèle que la réponse de dommage à l'ADN est requise à l'activation de p53 lors des sénescences induites par RasV12, STAT5A et E2F1 [606]. Deux autres études similaires confirment nos résultats obtenus avec RasV12 et permettent d'ajouter Mos et Cdc6 à cette liste d'oncogènes engageant la voie de réponse de dommage à l'ADN [21, 102]. Conjointement, ces travaux montrent, à l'aide d'expériences de déplétion par shRNA, que



les kinases ATM, ATR, Chk1 et Chk2 responsables de la réponse de dommage à l'ADN sont impliquées dans la sénescence induite par les oncogènes. Nous suggérons donc que l'activité oncogénique endommage l'ADN et que les protéines responsables de la reconnaissance de ces bris constituent les senseurs du stress oncogénique.

### **Quels sont les causes du dommage de l'ADN lors de la sénescence induite par les oncogènes?**

L'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires, ainsi que d'autres facteurs de transcription liant l'ADN dont AP-1, nécessite la formation de bris double brin transitoires par la topoisomérase II $\beta$  [623]. Il est alors possible que la forte activité transcriptionnelle accompagnant l'expression d'oncogènes déclenche la formation de bris par la topoisomérase II $\beta$  et que l'accumulation de ces bris déclenche la sénescence. De plus, les sites de clivage induits par la topoisomérase II $\beta$  permettent d'enlever l'histone H1 pour la remplacer par HMGB1 [623]. On peut alors effectuer un lien avec la sénescence induite par Ras qui est elle aussi accompagnée d'une perte de l'histone H1 suivie d'une augmentation de HMGA2 en seulement 24 heures suite à l'expression de l'oncogène [335]. Puisque la protéine HMGA2 est associée à la formation de SAHF [340], ce remplacement de l'histone H1 par HMGA2 pourrait permettre la formation de SAHF. Bien qu'aucune co-localisation n'a pu être établie entre les sites de dommage à l'ADN et les SAHF, il est possible que les bris induits par la topoisomérase II $\beta$  contribuent à permettre l'intégration de HMGA2 dans les sites associés à une forte activité transcriptionnelle en présence d'oncogènes. Les bris de l'ADN formés par la topoisomérase II $\beta$  pourraient donc contribuer à la formation des sites de dommage de l'ADN et participer à la création des SAHF observés lors de la sénescence induite par les oncogènes.

Une autre hypothèse pouvant expliquer l'accumulation de dommages de l'ADN lors de la sénescence déclenchée par les oncogènes est la diminution des niveaux de gènes responsables de la réparation de l'ADN. L'analyse du profil d'expression génique de la

sénescence induite par Ras [624] démontre une réduction importante de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, dont *RECQL4*, *BRCA1/2*, *Rad51* et *XRCC4*, ce qui pourrait expliquer la réponse de dommage à l'ADN soutenue observée lors de ces types de sénescence. Cette diminution au niveau transcriptionnel de facteurs de réparation de l'ADN pourrait contribuer à l'accumulation de bris d'ADN et ainsi activer une réponse de dommage à l'ADN soutenue.

### **Dynamique de la réponse de dommage à l'ADN**

Une avenue nécessitant d'être explorée concernant les foyers de dommage à l'ADN est la dynamique de leur formation lors de la sénescence induite par les oncogènes. Les lésions causées à l'ADN sont-elles réparées puis régénérées ou permanentes? La sénescence est-elle alors causée par l'accumulation de bris irréparables? L'utilisation de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, comme Rad51 ou BRCA1/2, fusionnées à la GFP permettrait de suivre la cinétique des foyers de dommage grâce à la microscopie de cellules vivantes.

La réponse de dommage à l'ADN soutenue observée lors de la sénescence induite par les oncogènes pourrait aussi être causée par l'incapacité de mettre fin à cette réponse. Une phosphatase permet de déphosphoryler  $\gamma$ H2AX afin d'arrêter la réponse de dommage à l'ADN [625, 626]. La protéine phosphatase PP2A localise avec  $\gamma$ H2AX aux foyers de dommage à l'ADN et déphosphoryle  $\gamma$ H2AX *in vitro*. La déplétion de PP2A cause la persistance des foyers de dommage et l'inefficacité de la réparation des lésions [626]. Or, PP2A localise également aux PML-NBs [391]. Lors de la sénescence les niveaux de PML ainsi que la taille et le nombre de PML-NBs augmentent. Il est alors probable que durant la sénescence, l'activité PP2A soit totalement séquestrée aux PML-NBs où PP2A déphosphoryle ses substrats Rb, Myc et Akt, et est donc incapable de mettre fin au signal de dommage à l'ADN. PML pourrait alors contribuer au maintien de la réponse de dommage à l'ADN en séquestrant l'activité PP2A.

## **Implication des sites de dommage à l'ADN lors de la transformation cellulaire**

La réponse de dommage à l'ADN est fortement activée dans les cancers ainsi que les lésions pré-tumorales et semble constituer la force majeure menant à la perte de p53 dans les cancers [627-629]. Puisque ces cellules cancéreuses ont trouvé un moyen de contourner la sénescence, le contournement de la sénescence ne devrait donc pas éliminer la présence de foyers de dommage à l'ADN. Ainsi, nous avons démontré que les cellules échappant à la sénescence prolifèrent en présence de dommages au niveau de leur ADN. La prolifération en présence de dommages à l'ADN signifie que les cellules cancéreuses doivent bloquer ou devenir insensibles à la réponse de dommage à l'ADN. De plus, la présence de bris au niveau de l'ADN pourrait également constituer une source d'instabilité génétique et de mutations afin de promouvoir la transformation cellulaire.

Le rôle joué par le dommage de l'ADN et sa réponse était déjà connu pour les sénescences répllicative, liée à la dysfonction des télomères et induites par certaines drogues. La mise en évidence du rôle crucial de la réponse de dommage à l'ADN lors de la sénescence induite par les oncogènes montre que cette réponse est commune à de nombreux types de sénescence. En fait, il est maintenant possible d'unifier les différents modèles de sénescence et de les placer sous l'influence de la réponse du dommage à l'ADN. De plus, la sénescence est un mécanisme de suppression tumoral complexe dont la stabilité provient de sa capacité à engager de multiples voies de suppression tumorale.

## **L'activation constitutive de STAT5 induit un programme génétique menant à la sénescence**

### **La voie de Jak/STAT**

La sénescence prématurée induite par STAT5 représente un nouveau modèle de sénescence permettant la découverte de nouvelles avenues menant à l'activation des voies de suppression tumorale de p53 et Rb. De plus, l'analyse comparative des ARNm régulés durant la sénescence par STAT5 et d'autres types de sénescence permet de mettre en évidence des voies communes engagées lors de la sénescence. Nous avons donc analysé le patron d'expression génique de la sénescence causée par STAT5 à l'aide de micropuces. Tout d'abord, l'augmentation des messagers de cibles transcriptionnelles de STAT5, dont plusieurs membres de la famille *SOCS* [630] ainsi que la *cycline D2* [631], confirme en quelque sorte l'activation constitutive du mutant de STAT5 utilisé lors de nos études (Tableau I). Parmi les gènes régulés par STAT5, certains pourraient contribuer à l'arrêt de croissance causé par STAT5 et participer à l'engagement des voies de p53 et Rb. L'étude du profil d'expression génique a d'ailleurs permis d'identifier plusieurs gènes intéressants pouvant potentiellement représenter des régulateurs de p53 ou Rb. Par exemple, les niveaux de *SOCS-1*, inhibiteur de la voie Jak/STAT et cible transcriptionnelle de STAT5 [632], augmentent d'environ huit fois lors de la sénescence induite par STAT5 (Tableau I).

### **Un gène cible de STAT5 régule la sénescence : SOCS-1, un nouveau joueur**

À la recherche de nouveaux régulateurs de la sénescence situés en aval de STAT5, nous avons étudié le rôle de SOCS-1 lors de la sénescence. Tout d'abord, nous avons confirmé l'augmentation de l'ARNm de SOCS-1 lors de la sénescence induite par STAT5

**Tableau I. Profil d'expression génique lors de la sénescence induite par STAT5.** La comparaison des niveaux d'expression d'ARNm de fibroblastes humains IMR90 infectés par pBabe ou pBabeSTAT5A1\*6 fut effectuée grâce à la micropuce U133 couvrant le génome humain (Affymetrix). Le classement en groupements fonctionnels a été effectué grâce au logiciel DAVID accessible via *The Gene Ontology* ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)).

Groupements fonctionnels	Gènes	Variation (STAT5 Vs Contrôle)
<b>Signalisation</b>		
JAK/STAT	<i>SOCS-1</i>	+7,9
	<i>SOCS-2</i>	+3,0
	<i>CIS</i>	+3,0
	<i>Cyclin D2</i>	+2,6
TGF- $\beta$	<i>SMURF2</i>	+2,2
MAPK	<i>Phosphoprotein enriched in astrocytes 15 (PEA15)</i>	+2,2
	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3)</i>	+2,1
	<i>Mitogen-activated protein kinase phosphatase 5 (MKP5)</i>	-2,7
<b>Cycle cellulaire</b>	<i>Cell division cycle 20 (Cdc20)</i>	-3,2
	<i>Cell division cycle 25C (Cdc25C)</i>	-3,9
	<i>Polo-like kinase 1 (PLK1)</i>	-2,7
	<i>Response gene to complement (RGC-32)</i>	-32,1
	<i>Cyclin B2</i>	-2,3
	<i>Aurora kinase B (AURKB/STK12)</i>	-2,3
	<i>Topoisomerase II<math>\alpha</math> (TopoII<math>\alpha</math>)</i>	-2,3
	<i>Cell division cycle associated 8 (CDCA8/Borealin)</i>	-2,4
	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 5 (BIRC5/Survivin)</i>	-2,0
	<i>Plasminogen activator inhibitor 1 (Serpine1/PAI-1)</i>	+3,4
	<i>Glycogen synthase kinase 3 <math>\beta</math> (GSK3<math>\beta</math>)</i>	+2,2
	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory 55 kDa, gamma</i>	-8,0

---

	<i>(PIK3R3)</i>	
	<i>Checkpoint suppressor 1 (Ches1)</i>	+4,7
<b>Pompes à protons</b>	<i>ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal V1 subunit A (ATP6V1A)</i>	+2,1
	<i>ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal V1 subunit D (ATP6V1D)</i>	+2,7
	<i>ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal V1 subunit E (ATP6V1E)</i>	+2,1
<b>Formation de l'hétérochromatine</b>	<i>High mobility group protein A2 (HMGA2)</i>	+2,6
<b>Autre</b>	<i>Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2 (Cited2)</i>	+4,4

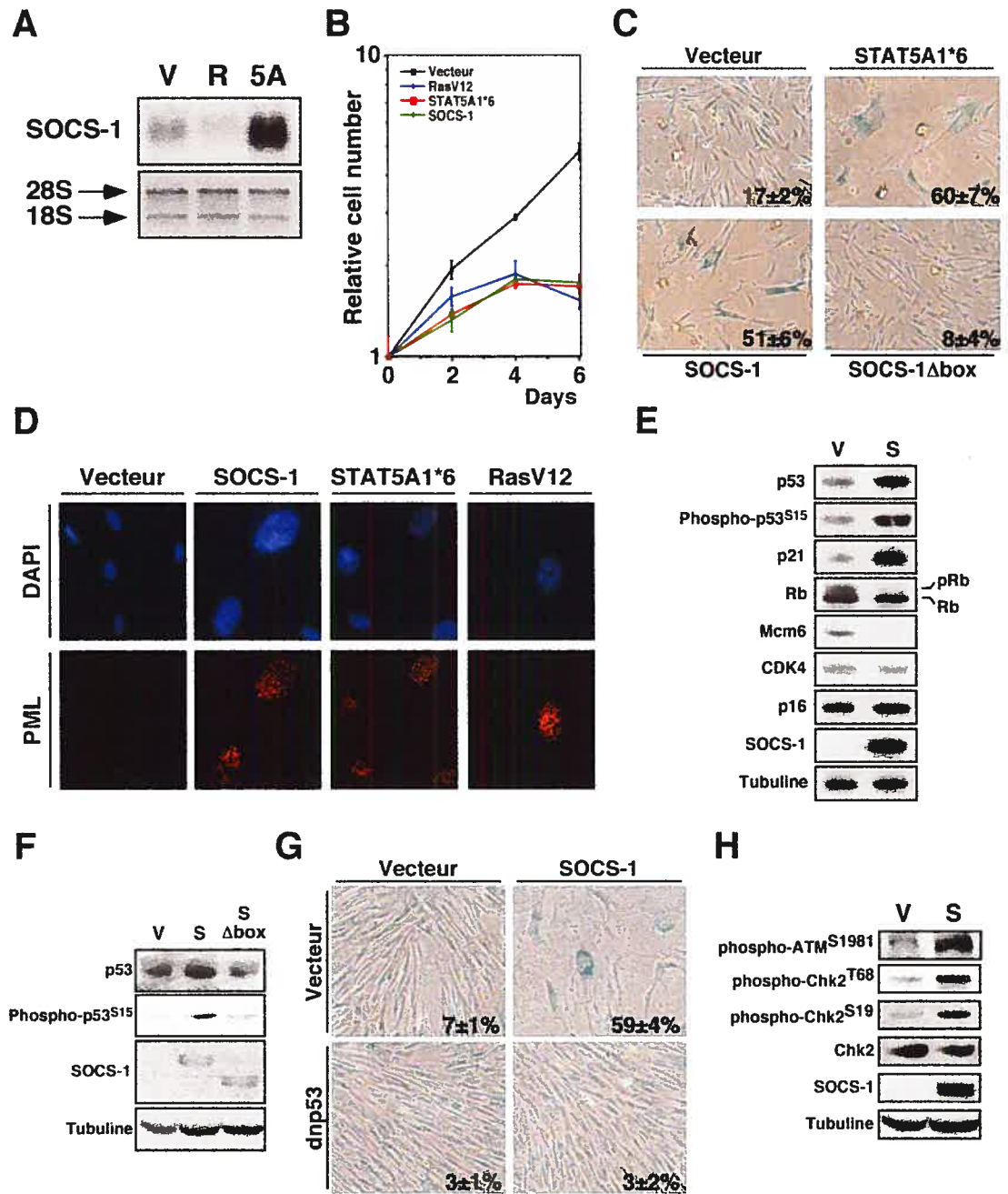
---

par buvardage de type *Northern* (Figure 2A). Par la suite, nous avons déterminé l'impact de l'expression de SOCS-1 dans les cellules normales humaines IMR90. Tout comme l'expression des oncogènes Ras et STAT5, SOCS-1 cause un arrêt de prolifération après seulement quatre jours (Figure 2B). Le changement de morphologie des cellules, l'augmentation de l'activité SA- $\beta$ -gal et l'induction des PML-NBs suggèrent que les cellules exprimant SOCS-1 entrent en sénescence prématurée (Figure 2C et D). La sénescence induite par SOCS-1 est accompagnée par une forte augmentation de p53 et de sa forme phosphorylée en sérine 15 (Figure 2E). Contrairement aux cellules exprimant STAT5, les cellules en sénescence par SOCS-1 arborent des niveaux élevés de p21 (Figure 2E). Cette augmentation de p21 permet d'expliquer le maintien de Rb sous sa forme hypophosphorylée et la réduction des gènes ciblés par E2F, dont *Mcm6*, en absence de diminution de CDK4 ou d'induction de p16<sup>INK4a</sup> (Figure 2E). La protéine SOCS-1 possède un domaine SH2 permettant de lier les tyrosines phosphorylées des récepteurs des cytokines activés ce qui empêche le recrutement des STATs. SOCS-1 contient également un domaine SOCSbox qui permet la formation d'un complexe ubiquitine ligase. Afin de déterminer le rôle du domaine SOCSbox dans la sénescence induite par SOCS-1, nous avons utilisé un mutant de SOCS-1 dont le domaine SOCSbox fut supprimé (SOCS-1 $\Delta$ box). Or, le mutant SOCS-1 $\Delta$ box n'est pas apte à induire la sénescence dans les cellules normales (Figure 2C). De plus, SOCS-1 $\Delta$ box est incapable d'activer p53 ou sa phosphorylation en sérine 15 (Figure 2F). Afin de clarifier le rôle de p53 lors de la sénescence induite par SOCS-1, nous avons généré des cellules exprimant un dominant négatif de p53. L'inactivation de la voie de p53 cause le contournement de la sénescence induite par SOCS-1 (Figure 2G). Finalement, l'expression de SOCS-1 cause l'activation d'une réponse de dommage à l'ADN comme le montre l'accumulation des formes phosphorylées de ATM et Chk2 (Figure 2H).

**Figure 2. Régulation de SOCS-1 par STAT5, induction de la sénescence et activation de p53 par SOCS-1.** **A)** Buvardage de type *Northern* montrant l'augmentation des niveaux d'ARNm de SOCS-1 par STAT5. **B)** Courbes de croissance de cellules IMR90 infectées avec un vecteur contrôle, RasV12, STAT5A1\*6 ou SOCS-1. **C)** Activité SA- $\beta$ -gal des cellules IMR90 infectées avec un vecteur contrôle, STAT5A1\*6, SOCS-1 ou un mutant de SOCS-1 ne possédant pas le domaine SOCSbox (SOCS-1 $\Delta$ box). **D)** Immunofluorescence indirecte dirigée contre PML dans les cellules IMR90 préparées en B). **E)** Analyse par immunobuvardage des régulateurs du cycle cellulaire chez les cellules IMR90 infectées avec le vecteur contrôle (V) ou SOCS-1 (S). **F)** Analyse par immunobuvardage de l'activation de p53 chez les cellules IMR90 infectées avec le vecteur contrôle (V), SOCS-1 (S) ou un mutant de SOCS-1 ne possédant pas le domaine SOCSbox (S $\Delta$ box). **G)** Activité SA- $\beta$ -gal des cellules IMR90 infectées avec un vecteur contrôle ou un mutant dominant négatif de p53, puis infectées avec un vecteur contrôle ou SOCS-1. **H)** Analyse par immunobuvardage de l'activation de la voie de réponse du dommage à l'ADN chez les cellules IMR90 infectées avec le vecteur contrôle (V), SOCS-1 (S). Pour les données en C) et H), le pourcentage de cellules sénescents obtenues est indiqué en bas à droite.



Figure 2



L'analyse du profil d'expression génique de la sénescence induite par STAT5 a permis la découverte d'un nouveau régulateur de la voie de p53 et de la sénescence. Les sénescences induites par STAT5 et SOCS-1 sont cependant différentes. Tout d'abord, la sénescence par STAT5 dans les cellules humaines requiert la voie de p53 ou de Rb tandis que le phénotype causé par SOCS-1 semble dépendre obligatoirement de p53 suggérant que SOCS-1 agit en aval de STAT5. De plus, SOCS-1 contribue à l'activation de p53 par STAT5, car sa déplétion diminue l'accumulation de p53 (données non montrées, Viviane Calabrese, F.A.M et G.F.). Le patron d'activation de p53 diffère entre les sénescences causées par STAT5 et SOCS-1. L'expression de SOCS-1 mène à l'induction de p21 contrairement à ce qui est observé suite à l'introduction de STAT5 dans les cellules. Les niveaux d'expression plus élevés de SOCS-1 que ceux obtenus par l'activation constitutive de STAT5 pourraient expliquer cette différence (données non montrées, F.A.M et G.F.). Le mécanisme d'activation de p53 par l'ubiquitine ligase SOCS-1 doit cependant être approfondi tout comme le rôle de la réponse de dommage à l'ADN lors de ce type de sénescence.

### **La voie de TGF- $\beta$**

Quelques gènes impliqués dans le voie de signalisation de TGF- $\beta$  sont également régulés lors de la sénescence induite par STAT5. Entre autres, les niveaux d'ARNm de l'ubiquitine ligase responsable de la dégradation des SMADs, SMURF2, doublent durant la sénescence induite par STAT5 (Tableau I). Ce régulateur négatif de la voie de TGF- $\beta$  est également augmenté lors de la sénescence répliquative et sa surexpression permet l'entrée en sénescence [633]. Tout comme la sénescence induite par STAT5, l'arrêt de prolifération causé par SMURF2 n'est contourné que par l'inactivation simultanée des voies de p53 et Rb. Bien que le mécanisme de régulation de SMURF2 par STAT5 et lors de la sénescence répliquative demeure inconnu, tout comme le rôle et les cibles de cette ubiquitine ligase, SMURF2 pourrait contribuer à l'établissement du phénotype de sénescence. Il serait alors

intéressant de déterminer la contribution de cette protéine lors de la sénescence induite par les oncogènes.

### **La voie des MAPKs**

Il est maintenant clair que la voie des MAPKs est contrôlée lors de la sénescence. Tout d'abord, les protéines Erk1 et 2 sont activement relocalisées au cytoplasme lors des sénescences répllicative et induite par Ras ce qui représente un moyen de réguler l'activité de Erk1/2 [634, 635]. Cette relocalisation cytoplasmique de Erk1/2 est obtenue grâce à la protéine d'export nucléaire PEA-15 [636]. Or, les niveaux d'ARNm et protéiques (données non montrées, Marie-France Gaumont-Leclerc et G.F.) de PEA-15 sont également augmentés lors de la sénescence induite par STAT5 (Tableau I). La relocalisation cytoplasmique de Erk1/2 pourrait représenter un mécanisme commun que partagent les sénescences induites par les oncogènes ainsi que la sénescence répllicative. Cette relocalisation cytoplasmique de Erk1/2 au cytoplasme permettrait l'inhibition de l'activité nucléaire de Erk mais pourrait également permettre la phosphorylation de cibles cytoplasmiques de Erk afin de participer à la sénescence. Il serait alors pertinent d'évaluer l'importance de la voie de Erk1/2 à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques ou de shRNAs.

La voie de p38 représente un élément important de la sénescence induite par Ras et est aussi activée lors de la sénescence répllicative [106, 107]. La voie de p38 pourrait également potentiellement participer à la sénescence induite par STAT5, puisqu'une augmentation des niveaux d'ARNm de *MKK3*, kinase responsable de l'activation de p38 [637], ainsi qu'une diminution de *MKP5*, phosphatase inhibant p38 [638], furent observées lors de la sénescence causée par STAT5 (Tableau I).

## Les régulateurs du cycle cellulaire

De plus, les niveaux de *GSK3 $\beta$*  sont plus élevés suite à l'expression de STAT5 ce qui pourrait représenter un mécanisme d'inactivation de la cycline D (Tableau I). En fait, l'axe PI(3)K-PKB-GSK3 $\beta$  contrôle la localisation et la dégradation de la cycline D. L'activation de PI(3)K déclenche l'activation subséquente de PKB qui par la suite phosphoryle en sérine 9 GSK3 $\beta$  ce qui l'inactive [639]. GSK3 $\beta$  phosphoryle en thréonine 286 la cycline D causant ainsi son ubiquitination par SCF<sup>FBX4- $\alpha$ B Crystallin</sup>, sa dégradation et son exclusion nucléaire [640, 641]. L'activation de la voie de GSK3 $\beta$  par PAI-1 est d'ailleurs suffisante à l'entrée en sénescence [115]. Lors de l'activation constitutive de STAT5, les niveaux d'ARNm de *PAI-1*, cible transcriptionnelle de p53, augmentent de près de 3,4 fois pouvant donc causer l'activation de GSK3 $\beta$  et mener à la dégradation et l'exclusion nucléaire de la cycline D (Tableau I). De plus, une forte diminution de la sous-unité régulatrice de la PI(3)K est observée, ce qui représente un mécanisme potentiel d'activation de GSK3 $\beta$ . Bien que la régulation de la voie PI(3)K-PKB-GSK3 $\beta$  s'effectue principalement de façon post-traductionnelle, l'augmentation ou la diminution des niveaux d'ARNm des protéines impliquées dans cette voie pourrait également contribuer à son activation.

L'arrêt de croissance causé par l'expression d'un mutant constitutivement activé de STAT5 s'effectue principalement en G1. Toutefois, une certaine proportion des cellules arbore un contenu d'ADN équivalent à 4N (article 2). Bien qu'il soit probable que ces cellules soient arrêtées en phase G2/M, cette population pourrait également représenter des cellules binucléées résultant d'un défaut de cytokinèse. Ainsi, les niveaux d'ARNm de nombreux gènes impliqués dans la transition G2/M du cycle cellulaire, dont *Cdc20*, *Cdc25C*, *PLK1*, *RGC-32* et *cycline B2*, sont également diminués lors de la sénescence induite par STAT5 (Tableau I). De plus, les niveaux de certains gènes impliqués lors de la mitose comme *Aurora kinase B*, *topoII $\alpha$* , *boréaline* et *survivine* sont aussi diminués. Boréaline et survivine sont d'ailleurs impliqués lors des étapes tardives de la mitose ainsi

que dans la cytokinèse. L'inhibition de boréaline, survivine ou PLK1 cause des défauts de cytokinèse et mène à la formation de cellules tétraploïdes possédant deux noyaux [642-644]. Ce patron d'expression de gènes impliqués lors des phases G2 et M du cycle cellulaire n'est pas unique à la sénescence par STAT5, mais se retrouve également chez les cellules exprimant l'oncogène Ras [624]. Cette régulation négative de gènes impliqués dans la transition G2/M pourrait contribuer à l'arrêt de croissance déclenché lors de la sénescence ainsi qu'à l'accumulation de cellules multinucléées représentant environ 15% de la population cellulaire lors de la sénescence induite par STAT5 (données non publiées, F.A.M. et G.F.). La diminution des gènes G2/M pourrait constituer une seconde barrière permettant l'arrêt des cellules ayant préalablement échappées à l'arrêt en G1.

Un autre gène intéressant fut identifié dans le profil des cellules sénescents par STAT5. Le facteur de transcription Ches1 permet de rétablir les points de contrôle chez la levure mutante pour *Mec1*, l'orthologue de ATR [645]. Ches1, de la famille forkhead, permet également l'entrée en sénescence (données non publiées, Laurent Doucet et G.F.). Le rôle de Ches1 dans la régulation du cycle cellulaire, de la réponse du dommage à l'ADN et de la sénescence doit toutefois être approfondi.

## Le lysosome

L'activité SA- $\beta$ -gal utilisée comme marqueur de sénescence provient de la  $\beta$ -galactosidase lysosomale [82]. Depuis maintenant plus de 30 ans, il est d'ailleurs connu que le contenu lysosomal augmente lors de la sénescence répllicative [79]. L'analyse du profil génétique de la sénescence induite par STAT5 démontre aussi l'augmentation de trois sous-unités de la pompe à protons lysosomale (ATP6V1A, ATP6V1D, ATP6V1E) responsable de l'acidification de cette organelle (Tableau I) [646]. Le rôle de l'augmentation de l'activité lysosomale lors de la sénescence demeure aujourd'hui inconnu et son étude pourrait mener à l'identification de nouveaux marqueurs de sénescence.

## La formation de l'hétérochromatine

Un aspect nécessitant d'être approfondi lors de la sénescence induite par STAT5 est la formation de foyers d'hétérochromatine (SAHF). La formation de SAHF permet d'assurer une répression stable des gènes régulant la prolifération cellulaire, comme les cibles de E2F [338]. Bien que les cellules entrant en sénescence suite à l'activation de STAT5 ne semblent pas former des foyers denses colorés au DAPI, il n'est pas possible d'exclure la possibilité de formation de SAHF. La détection par immunofluorescence de foyers contenant HP1 ou HMGA1/2, deux constituants majeurs des SAHF [340], permettrait de tirer des conclusions plus claires concernant la formation de SAHF durant la sénescence induite par STAT5. D'ailleurs, les niveaux transcriptionnels de HMGA2 augmentent de façon significative lors de la sénescence causée par STAT5 (Tableau I). Il est possible que cette augmentation se traduise par un enrichissement des niveaux protéiques de HMGA2 ainsi que son incorporation dans la chromatine afin de permettre la répression transcriptionnelle. Le phénotype de sénescence déclenché par cet oncogène est d'ailleurs très stable et subsiste plus de 3 semaines en culture (données non publiées, F.A.M. et G.F.). Cette stabilité du phénotype suggère la présence d'un programme de répression stable des gènes de prolifération.

Le modèle de sénescence induite par l'oncogène STAT5 représente donc une ressource inédite permettant la découverte de nouveaux régulateurs de la sénescence. De plus, une comparaison approfondie des profils d'expression géniques des sénescences déclenchées par RasV12 et STAT5 rendrait également possible l'identification de gènes communs responsables de l'établissement du phénotype de sénescence. Finalement, les données présentées dans les articles 2 et 3 ainsi que l'analyse du profil d'expression génique suggèrent que l'activation constitutive de STAT5 déclenche une myriade de réponses afin d'engager un réseau complexe de suppression tumorale menant à la sénescence prématurée. La présence de ce réseau complexe permet d'assurer l'activation

des voies majeures de suppression tumorale de p53 et Rb afin de résister efficacement à la transformation cellulaire.

## STAT5 et l'activation de p53

L'activation de la voie de réponse de dommage à l'ADN lors de la sénescence induite par STAT5 contribue à l'activation de p53. Toutefois, STAT5 ne semble pas stimuler de façon classique p53, puisque l'on observe aucune augmentation des niveaux de p21 lors de ce type de sénescence (article 2). Afin d'étudier le patron d'activation de p53 lors de la sénescence déclenchée par STAT5, nous avons utilisé une micropuce contenant plusieurs gènes ciblés par p53 (Oligo GEArray® human p53 signaling pathway microarray, SuperArray Bioscience). Cette expérience a permis d'identifier une intéressante collection de gènes régulés par p53 lors de la sénescence causée par STAT5 (Tableau II).

Les cibles de p53 induites lors de la sénescence déclenchée par STAT5 incluent trois suppresseurs tumoraux potentiels, *DAPK1* [647], *FRAP1* [648] et *NDRG1* [649, 650], ainsi que *p53* [651, 652] (Tableau II). L'augmentation du gène *GAS3/PMP-22* est également intéressante puisque ce gène fut antérieurement associé à l'arrêt de la prolifération [653]. Les niveaux d'expression des gènes *BIRC5/survivine* et *PTTG1/sécurine* impliqués dans la cytokinèse [654], sont diminués lors de la sénescence induite par STAT5. Ces deux gènes sont d'ailleurs connus pour être réprimés par p53 [655]. De plus, ce profil d'expression ne démontre aucune variation des niveaux d'ARNm de *CDKN1A/p21* (données non montrées, F.A.M. et G.F.). Contrairement à la sénescence induite par Ras, on observe une diminution des niveaux de *CDKN2A/p16* confirmant la nécessité d'engager une voie différente de p16<sup>INK4a</sup> afin de stimuler Rb lors de la sénescence par STAT5 (article 2).

**Tableau II. Gènes ciblés par p53 régulés lors de la sénescence induite par STAT5.** La micropuce Oligo GEMArray® human p53 signaling pathway microarray (SuperArray Bioscience) a été utilisée.

Gènes	Variation des niveaux (STAT5 Vs contrôle)
Gènes augmentés	
<i>DAPK1</i>	1,58
<i>FRAP1</i>	1,86
<i>IGFR1</i>	1,82
<i>IL6</i>	2,89
<i>NDRG1</i>	2,16
<i>GAS3/PMP-22</i>	2,02
<i>PPP1R9B</i>	1,73
<i>RELA</i>	1,97
<i>SHC1</i>	1,66
<i>TNFRSF10B</i>	2,21
<i>TP53</i>	2,25
Gènes diminués	
<i>BIRC5/survivine</i>	-2,42
<i>CCNE2</i>	-2,04
<i>CDKN2A</i>	-1,62
<i>DAXX</i>	-1,58
<i>E2F1</i>	-2,12
<i>EI24</i>	-1,89
<i>GAS1</i>	-2,68
<i>PTTG1/sécurine</i>	-1,68



Ces données indiquent que l'activation constitutive de STAT5 stimule la voie de p53 en induisant un nouveau patron de gènes ciblés par p53. Puisque la source de l'activation de p53, soit la réponse de dommage à l'ADN, est la même lors des sénescence induites par Ras et STAT5, comment est-il possible d'obtenir deux patrons d'activation de p53 différents? Tout d'abord, les réponses de dommage à l'ADN déclenchées par Ras et STAT5 ne sont pas totalement équivalentes. Par exemple, l'activation de Chk2 n'est pas identique lors des sénescences induites par Ras et STAT5. Selon nos résultats, l'activation constitutive de STAT5 mène à la phosphorylation en thréonine 68 de Chk2 tandis que la sérine 19 est ciblée lors de la sénescence induite par Ras [606]. Cette différence démontre que les signaux activant Chk2 lors des sénescences causées par Ras et STAT5 ne sont pas équivalents et pourraient mener à une activation dissemblable de p53. Il est également possible que STAT5 et Ras activent différents facteurs contribuant à l'activation de p53. Par exemple, STAT5 augmente drastiquement les niveaux de SOCS-1 (Figure 2A et tableau I). Or, SOCS-1 active fortement p53 (Figure 2E) et contribue à l'activation de p53 lors de la sénescence induite par STAT5 (données non montrées, Viviane Calabrese, F.A.M. et G.F.).

## **Le modèle de sénescence induite par STAT5 : ressource permettant la découverte de nouveaux régulateurs des voies de p53 et Rb**

La sénescence cellulaire s'avère être un modèle éprouvé permettant la découverte de nouveaux suppresseurs tumoraux et de voies oncogéniques. L'utilisation de cellules normales modifiées afin d'altérer leur capacité à entrer en sénescence a permis le criblage de banques d'ADNc, de shRNAs et même de miRNAs afin de mettre en évidence de nombreux gènes régulant le phénomène de sénescence dont *BCL6*, *CBX7*, *KLF4*, *hDRIL1*, *PITX1*, *REST*, *TBX2* et miRNA372/373 (Tableau III). Toutefois, la plupart de ces

**Tableau III. Suppresseurs tumoraux et oncogènes permettant le contournement de la sénescence et/ou la transformation cellulaire découverts par criblage de différentes banques.**

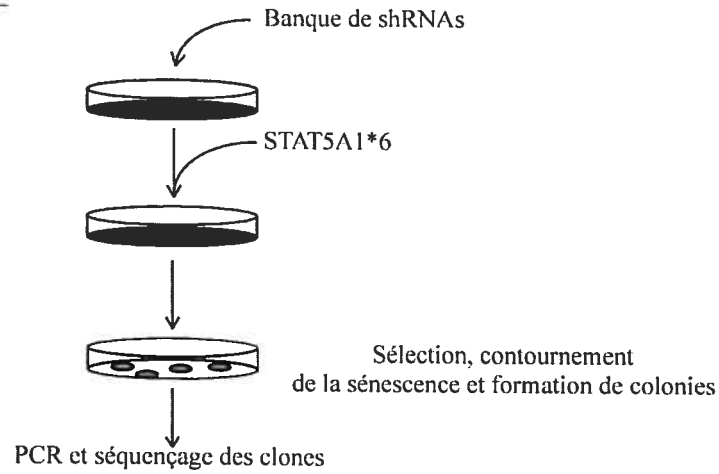
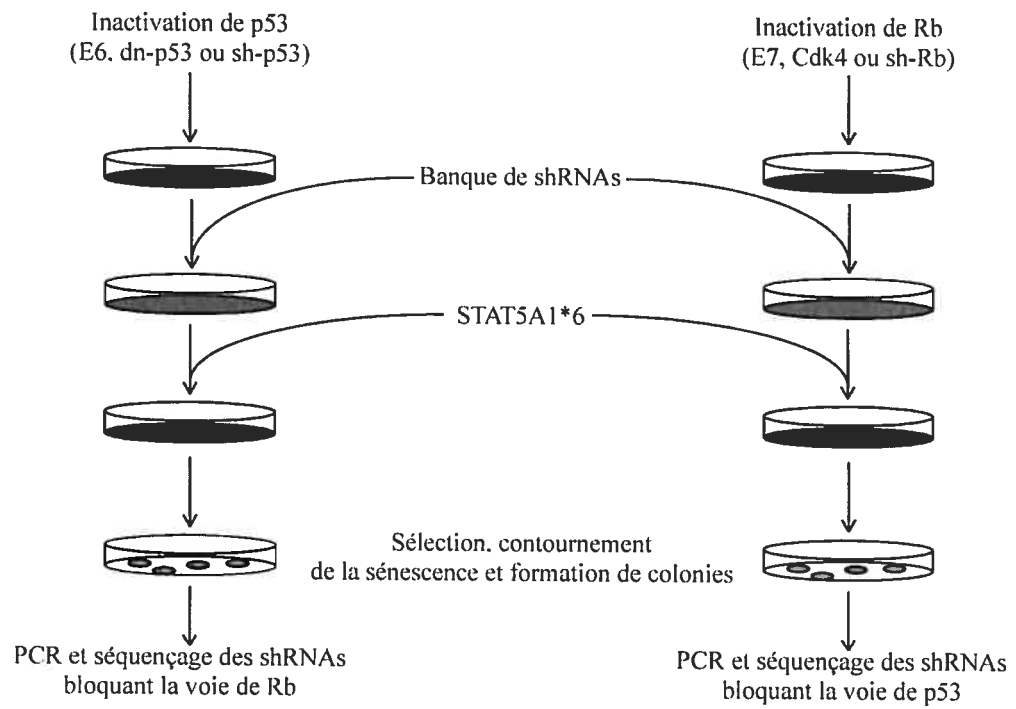
Gènes	Type de banque	Voie ciblée	Méthode de criblage	Références
<i>Seladin-1</i>	GSE	Liaison de p53, déplacement de Mdm2 et activation de p53	Sénescence induite par Ras (Ras-REF)	[140]
<i>BCL6</i>	ADNc	Augmentation des niveaux de cycline D1	Sénescence dépendante de p53 (tsT-MEFs)	[211]
<i>CBX7</i>	ADNc	Répression du locus <i>INK4a/ARF</i>	Sénescence répllicative (HprEC)	[297]
<i>hDRIL1</i>	ADNc	Activation de E2F1 et induction de cycline E	Sénescence induite par Ras (tsT/Ras-MEFs)	[334]
<i>KLF4</i>	ADNc	Répression transcriptionnelle de p53	Sénescence induite par Ras (tsT/Ras-MEFs)	[212]
<i>TBX2</i>	ADNc	Répression du locus <i>INK4a/ARF</i>	Sénescence induite par INK4a/ARF (Bmi <sup>-/-</sup> MEFs)	[287]
<i>PITX1</i>	shRNA	Inhibition de Ras par RASAL1 (GAP)	Transformation de cellules primaires modifiées (hTERT/st/shp53/shp16-BJ)	[656]
<i>KLF4</i>	shRNA	n/d	Transformation de cellules primaires modifiées (hTERT/st/shp53/shp16-BJ)	[656]
<i>REST</i>	shRNA	Inhibition de la signalisation par PI(3)K	Transformation de cellules primaires modifiées (hTERT/LT/myc-HMEC)	[657]
<i>miRNA372/373</i>	miRNA	LATS2/cycline E/Cdk2 (aussi Suv39H1)	Sénescence induite par Ras (Ras-BJ)	[351]

expériences ont été effectuées avec des cellules exprimant l'oncogène Ras. Il est donc probable que les différentes voies découvertes par cette approche soient spécifiques à la réponse induite par Ras. Il serait alors pertinent de reprendre ce type d'expérience de criblage avec le modèle de sénescence induite par STAT5 afin d'examiner les voies de suppression tumorale impliquées et de les comparer à celles activées par Ras.

Deux modèles de criblage de banques de shRNAs peuvent être proposés afin d'identifier des régulateurs importants des voies de p53 et Rb lors de la sénescence induite par STAT5 (Figure 3). Tout d'abord, il est possible de mettre à profit la dépendance des voies de p53 et de Rb lors de la sénescence dans les cellules de souris. Dans ce système cellulaire, la sénescence induite par STAT5 requiert la fonctionnalité des voies de p53 et de Rb. Dans ce contexte, l'inactivation d'un élément responsable de l'activation de p53 ou de Rb permettra donc le contournement de la sénescence et la formation de colonies en culture sur pétris ou en absence d'ancrage en agar souple. Afin d'effectuer le criblage, une population de MEFs sera infectée à l'aide d'une banque rétrovirale de shRNAs [658]. Cette population hétérogène pourra par la suite être infectée à l'aide d'un rétrovirus exprimant STAT5A1\*6 afin de causer le phénotype de sénescence. Les cellules exprimant un shRNA inhibant le déclenchement par STAT5 de la voie de Rb ou de p53 contourneront la sénescence et proliféreront afin de former des colonies. Ces colonies pourront être isolées afin d'en isoler l'ADN génomique pour finalement amplifier par PCR le shRNA et le séquencer.

La seconde méthode de criblage suit la même logique que le procédé utilisé avec les MEFs tout en profitant du caractère plus stable de la sénescence causée par STAT5 dans les fibroblastes humains IMR90. Dans ce système, l'arrêt de croissance déclenché par STAT5 n'est pas contourné par l'inactivation indépendante de p53 ou de Rb, mais bien par l'inhibition simultanée de ces voies de suppression tumorale. Il est donc possible de créer des populations sensibilisées au contournement de la sénescence en bloquant préalablement

**Figure 3. Méthodologie expérimentale proposée afin d'identifier les régulateurs des voies de p53 et de Rb impliqués lors de la sénescence induite par STAT5 par criblage d'une banque de shRNAs.** **A)** Approche expérimentale afin d'effectuer le criblage chez les cellules de souris MEFs. Les MEFs infectés avec la banque rétrovirale de shRNAs sont ensuite infectés par STAT5A1\*6. L'ADN des colonies obtenues est isolé puis les shRNAs sont séquencés. **B)** Criblage de la banque de shRNAs dans les cellules humaines. Des fibroblastes diploïdes humains IMR90 exprimant la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) sont infectés avec une molécule inactivant la voie de p53 ou Rb. Par la suite, le protocole utilisé pour les MEFs est employé afin d'effectuer le criblage.

**Figure 3****A****MEF****B****IMR90-hTERT**

les voies de p53 ou de Rb afin de cibler spécifiquement des régulateurs de la voie de p53 ou de Rb requis lors de la sénescence induite par STAT5 (Figure 3). L'utilisation de fibroblastes IMR90 exprimant la sous-unité catalytique de la télomérase permet d'augmenter la capacité de prolifération des colonies. L'utilisation de tels systèmes où la voie de p53 ou de Rb est inactivée permet de sensibiliser les cellules au contournement de la sénescence afin d'identifier des régulateurs spécifiques des voies de Rb ou p53 respectivement. Cette approche mènera à l'identification de nouvelles voies de suppression tumorale et à la compréhension des voies utilisées lors de la sénescence induite par STAT5.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Les résultats des études présentées dans cette thèse dévoilent le rôle important de différents mécanismes de suppression tumorale impliqués lors de la sénescence induite par les oncogènes. Tout d'abord, nous avons démontré l'important rôle joué par les membres de la famille de Rb lors de la sénescence induite par PML. Nous avons par la suite montré que l'activation constitutive de l'oncogène STAT5 cause l'entrée prématurée en sénescence en activant les voies de Rb et p53. Bien que ces voies soient partagées avec d'autres types de sénescence dont celle induite par Ras, STAT5 les engage de façon différente en diminuant les niveaux de CDK4 et en permettant un patron unique d'expression des gènes régulés par p53. Finalement, nous avons montré que différents stress oncogéniques dont E2F1, Ras et STAT5, engagent la voie de p53 en activant une réponse de dommage à l'ADN. Les oncogènes déclenchent donc un réseau complexe de suppression tumorale permettant de prévenir la transformation cellulaire.

Le cancer est encore considéré comme une maladie très complexe possédant une forte capacité d'adaptation dont les traitements plutôt grossiers causent autant de tort au patient qu'à la tumeur. Or, la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués lors de la suppression tumorale provoquée par la sénescence suggère de nouvelles cibles thérapeutiques afin de combattre le cancer. Par ailleurs, puisque les cancers surviennent suite au découplage des réseaux moléculaires reliant la prolifération et la suppression tumorale, l'intervention humaine adroite afin de reconnecter ces réseaux annonce une nouvelle ère de thérapies efficaces et spécifiques aux tumeurs.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Imbault-Huart, M.J. (1984). Histoire du cancer. *L'Histoire* 74, 74-77.
2. Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada (2007). Statistiques canadiennes sur le cancer 2007. Toronto, Canada.
3. Coalition Priorité Cancer au Québec (2006). Les impacts du cancer sur la collectivité. Forum sur le cancer au Québec.
4. Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine* 10, 789-799.
5. Ruley, H.E. (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304, 602-606.
6. Land, H., Parada, L.F., and Weinberg, R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.
7. Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., and Sherr, C.J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649-659.
8. Metz, T., Harris, A.W., and Adams, J.M. (1995). Absence of p53 allows direct immortalization of hematopoietic cells by the myc and raf oncogenes. *Cell* 82, 29-36.
9. Rangarajan, A., Hong, S.J., Gifford, A., and Weinberg, R.A. (2004). Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer cell* 6, 171-183.
10. Stevenson, M., and Volsky, D.J. (1986). Activated v-myc and v-ras oncogenes do not transform normal human lymphocytes. *Molecular and cellular biology* 6, 3410-3417.
11. Drayton, S., Rowe, J., Jones, R., Vatcheva, R., Cuthbert-Heavens, D., Marshall, J., Fried, M., and Peters, G. (2003). Tumor suppressor p16INK4a determines sensitivity of human cells to transformation by cooperating cellular oncogenes. *Cancer cell* 4, 301-310.
12. Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., and Weinberg, R.A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-468.
13. Hahn, W.C., Dessain, S.K., Brooks, M.W., King, J.E., Elenbaas, B., Sabatini, D.M., DeCaprio, J.A., and Weinberg, R.A. (2002). Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Molecular and cellular biology* 22, 2111-2123.
14. Lazarov, M., Kubo, Y., Cai, T., Dajee, M., Tarutani, M., Lin, Q., Fang, M., Tao, S., Green, C.L., and Khavari, P.A. (2002). CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. *Nature medicine* 8, 1105-1114.
15. Seger, Y.R., Garcia-Cao, M., Piccinin, S., Cunsolo, C.L., Doglioni, C., Blasco, M.A., Hannon, G.J., and Maestro, R. (2002). Transformation of normal human cells in the absence of telomerase activation. *Cancer cell* 2, 401-413.
16. Voorhoeve, P.M., and Agami, R. (2003). The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer cell* 4, 311-319.



17. Wei, W., Jobling, W.A., Chen, W., Hahn, W.C., and Sedivy, J.M. (2003). Abolition of cyclin-dependent kinase inhibitor p16Ink4a and p21Cip1/Waf1 functions permits Ras-induced anchorage-independent growth in telomerase-immortalized human fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 23, 2859-2870.
18. Boehm, J.S., Hession, M.T., Bulmer, S.E., and Hahn, W.C. (2005). Transformation of human and murine fibroblasts without viral oncoproteins. *Molecular and cellular biology* 25, 6464-6474.
19. Kendall, S.D., Linardic, C.M., Adam, S.J., and Counter, C.M. (2005). A network of genetic events sufficient to convert normal human cells to a tumorigenic state. *Cancer research* 65, 9824-9828.
20. Elenbaas, B., Spirio, L., Koerner, F., Fleming, M.D., Zimonjic, D.B., Donaher, J.L., Popescu, N.C., Hahn, W.C., and Weinberg, R.A. (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes & development* 15, 50-65.
21. Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.
22. Okada, H., and Mak, T.W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4, 592-603.
23. Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 25, 585-621.
24. Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research* 37, 614-636.
25. McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* 26, 234-282.
26. Muller, H. (1938). The remaking of chromosomes. *Collecting Net* 13, 182-198.
27. Blackburn, E.H., and Gall, J.G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *Journal of molecular biology* 120, 33-53.
28. Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., and Wu, J.R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6622-6626.
29. Meyne, J., Ratliff, R.L., and Moyzis, R.K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 7049-7053.
30. Watson, J.D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239, 197-201.
31. Olovnikov, A.M. (1971). [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR* 201, 1496-1499.

32. Olovnikov, A.M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41, 181-190.
33. Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
34. Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413.
35. Autexier, C., and Lue, N.F. (2006). The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annual review of biochemistry* 75, 493-517.
36. Kilian, A., Bowtell, D.D., Abud, H.E., Hime, G.R., Venter, D.J., Keese, P.K., Duncan, E.L., Reddel, R.R., and Jefferson, R.A. (1997). Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Human molecular genetics* 6, 2011-2019.
37. Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., et al. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.
38. Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B., and Cech, T.R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science (New York, N.Y)* 277, 955-959.
39. Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M.B., Arruda, I., and Robinson, M.O. (1997). A mammalian telomerase-associated protein. *Science (New York, N.Y)* 275, 973-977.
40. Harrington, L., Zhou, W., McPhail, T., Oulton, R., Yeung, D.S., Mar, V., Bass, M.B., and Robinson, M.O. (1997). Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes & development* 11, 3109-3115.
41. Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J., et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science (New York, N.Y)* 269, 1236-1241.
42. Vaziri, H., and Benchimol, S. (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8, 279-282.
43. Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (New York, N.Y)* 279, 349-352.
44. Morales, C.P., Holt, S.E., Ouellette, M., Kaur, K.J., Yan, Y., Wilson, K.S., White, M.A., Wright, W.E., and Shay, J.W. (1999). Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nature genetics* 21, 115-118.
45. Jiang, X.R., Jimenez, G., Chang, E., Frolkis, M., Kusler, B., Sage, M., Beeche, M., Bodnar, A.G., Wahl, G.M., Tlsty, T.D., et al. (1999). Telomerase expression in

- human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nature genetics* 21, 111-114.
46. Steinert, S., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2000). Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 1095-1098.
  47. Damm, K., Hemmann, U., Garin-Chesa, P., Huel, N., Kauffmann, I., Priepke, H., Niestroj, C., Daiber, C., Enenkel, B., Guilliard, B., et al. (2001). A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *The EMBO journal* 20, 6958-6968.
  48. Zhou, X.Z., and Lu, K.P. (2001). The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* 107, 347-359.
  49. Harley, C.B. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 256, 271-282.
  50. Harley, C.B., Vaziri, H., Counter, C.M., and Allsopp, R.C. (1992). The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 27, 375-382.
  51. Baird, D.M., Rowson, J., Wynford-Thomas, D., and Kipling, D. (2003). Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nature genetics* 33, 203-207.
  52. Allsopp, R.C., and Harley, C.B. (1995). Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Experimental cell research* 219, 130-136.
  53. Autexier, C., and Greider, C.W. (1996). Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. *Trends in biochemical sciences* 21, 387-391.
  54. Zhu, J., Wang, H., Bishop, J.M., and Blackburn, E.H. (1999). Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3723-3728.
  55. Ducray, C., Pommier, J.P., Martins, L., Boussin, F.D., and Sabatier, L. (1999). Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during the human fibroblast immortalization process. *Oncogene* 18, 4211-4223.
  56. Hande, M.P., Samper, E., Lansdorp, P., and Blasco, M.A. (1999). Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *The Journal of cell biology* 144, 589-601.
  57. Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science (New York, N.Y)* 295, 2446-2449.
  58. de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development* 19, 2100-2110.
  59. Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.
  60. Stansel, R.M., de Lange, T., and Griffith, J.D. (2001). T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *The EMBO journal* 20, 5532-5540.

61. van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.
62. Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *The EMBO journal* 21, 4338-4348.
63. van Overbeek, M., and de Lange, T. (2006). Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. *Curr Biol* 16, 1295-1302.
64. Hockemeyer, D., Daniels, J.P., Takai, H., and de Lange, T. (2006). Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell* 126, 63-77.
65. Wu, L., Multani, A.S., He, H., Cosme-Blanco, W., Deng, Y., Deng, J.M., Bachilo, O., Pathak, S., Tahara, H., Bailey, S.M., et al. (2006). Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell* 126, 49-62.
66. Stewart, S.A., Ben-Porath, I., Carey, V.J., O'Connor, B.F., Hahn, W.C., and Weinberg, R.A. (2003). Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nature genetics* 33, 492-496.
67. Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., and Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (New York, N.Y)* 266, 2011-2015.
68. Masutomi, K., Yu, E.Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J.L., Metz, G.B., Brooks, M.W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J.A., et al. (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114, 241-253.
69. Sherwood, S.W., Rush, D., Ellsworth, J.L., and Schimke, R.T. (1988). Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 9086-9090.
70. Wada, T., Joza, N., Cheng, H.Y., Sasaki, T., Kozieradzki, I., Bachmaier, K., Katada, T., Schreiber, M., Wagner, E.F., Nishina, H., et al. (2004). MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nature cell biology* 6, 215-226.
71. Phillips, P.D., Kaji, K., and Cristofalo, V.J. (1984). Progressive loss of the proliferative response of senescing WI-38 cells to platelet-derived growth factor, epidermal growth factor, insulin, transferrin, and dexamethasone. *Journal of gerontology* 39, 11-17.
72. Cristofalo, V.J., Phillips, P.D., Sorger, T., and Gerhard, G. (1989). Alterations in the responsiveness of senescent cells to growth factors. *Journal of gerontology* 44, 55-62.
73. Cristofalo, V.J., and Pignolo, R.J. (1993). Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiological reviews* 73, 617-638.
74. Goldstein, S. (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science (New York, N.Y)* 249, 1129-1133.

75. Seshadri, T., and Campisi, J. (1990). Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science (New York, N.Y)* 247, 205-209.
76. Yang, H.S., and Hinds, P.W. (2003). Increased ezrin expression and activation by CDK5 coincident with acquisition of the senescent phenotype. *Molecular cell* 11, 1163-1176.
77. Alexander, K., Yang, H.S., and Hinds, P.W. (2004). Cellular senescence requires CDK5 repression of Rac1 activity. *Molecular and cellular biology* 24, 2808-2819.
78. Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9363-9367.
79. Robbins, E., Levine, E.M., and Eagle, H. (1970). Morphologic changes accompanying senescence of cultured human diploid cells. *The Journal of experimental medicine* 131, 1211-1222.
80. Brunk, U., Ericsson, J.L., Ponten, J., and Westermark, B. (1973). Residual bodies and "aging" in cultured human glia cells. Effect of entrance into phase 3 and prolonged periods of confluence. *Experimental eye research* 79, 1-14.
81. Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113 ( Pt 20), 3613-3622.
82. Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging cell* 5, 187-195.
83. Doggett, D.L., Rotenberg, M.O., Pignolo, R.J., Phillips, P.D., and Cristofalo, V.J. (1992). Differential gene expression between young and senescent, quiescent WI-38 cells. *Mechanisms of ageing and development* 65, 239-255.
84. Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, P.S., Choi, D., and Funk, W.D. (1999). Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* 9, 939-945.
85. Lumpkin, C.K., Jr., McClung, J.K., Pereira-Smith, O.M., and Smith, J.R. (1986). Existence of high abundance antiproliferative mRNA's in senescent human diploid fibroblasts. *Science (New York, N.Y)* 232, 393-395.
86. Comi, P., Chiaramonte, R., and Maier, J.A. (1995). Senescence-dependent regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor in human vascular endothelial cells. *Experimental cell research* 219, 304-308.
87. Goldstein, S., Moerman, E.J., Fujii, S., and Sobel, B.E. (1994). Overexpression of plasminogen activator inhibitor type-1 in senescent fibroblasts from normal subjects and those with Werner syndrome. *Journal of cellular physiology* 161, 571-579.
88. Mu, X.C., and Higgins, P.J. (1995). Differential growth state-dependent regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 expression in senescent IMR-90 human diploid fibroblasts. *Journal of cellular physiology* 165, 647-657.

89. Millis, A.J., Hoyle, M., McCue, H.M., and Martini, H. (1992). Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Experimental cell research* 201, 373-379.
90. Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S.W. (2000). PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes & development* 14, 2015-2027.
91. Petropoulou, C., Trougakos, I.P., Kolettas, E., Toussaint, O., and Gonos, E.S. (2001). Clusterin/apolipoprotein J is a novel biomarker of cellular senescence that does not affect the proliferative capacity of human diploid fibroblasts. *FEBS letters* 509, 287-297.
92. Krtolica, A., and Campisi, J. (2002). Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34, 1401-1414.
93. Sottile, J., Mann, D.M., Diemer, V., and Millis, A.J. (1989). Regulation of collagenase and collagenase mRNA production in early- and late-passage human diploid fibroblasts. *Journal of cellular physiology* 138, 281-290.
94. Millis, A.J., Sottile, J., Hoyle, M., Mann, D.M., and Diemer, V. (1989). Collagenase production by early and late passage cultures of human fibroblasts. *Experimental gerontology* 24, 559-575.
95. Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.I., McDougall, J.K., Galloway, D.A., and Klingelhutz, A.J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396, 84-88.
96. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
97. Wei, S., Wei, S., and Sedivy, J.M. (1999). Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer research* 59, 1539-1543.
98. Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research* 49, 4682-4689.
99. Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., van Aelst, L., Serrano, M., and Lowe, S.W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes & development* 12, 3008-3019.
100. Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., and Bishop, J.M. (1998). Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes & development* 12, 2997-3007.
101. Huot, T.J., Rowe, J., Harland, M., Drayton, S., Brookes, S., Gooptu, C., Purkis, P., Fried, M., Bataille, V., Hara, E., et al. (2002). Biallelic mutations in p16(INK4a) confer resistance to Ras- and Ets-induced senescence in human diploid fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 22, 8135-8143.
102. Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., et al. (2006).

- Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633-637.
103. Chen, G., Hitomi, M., Han, J., and Stacey, D.W. (2000). The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling. *The Journal of biological chemistry* 275, 38973-38980.
  104. Ono, K., and Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cellular signalling* 12, 1-13.
  105. Deng, Q., Liao, R., Wu, B.L., and Sun, P. (2004). High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 279, 1050-1059.
  106. Wang, W., Chen, J.X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J.J., Huang, S., and Sun, P. (2002). Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Molecular and cellular biology* 22, 3389-3403.
  107. Iwasa, H., Han, J., and Ishikawa, F. (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells* 8, 131-144.
  108. Sun, P., Yoshizuka, N., New, L., Moser, B.A., Li, Y., Liao, R., Xie, C., Chen, J., Deng, Q., Yamout, M., et al. (2007). PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* 128, 295-308.
  109. Damalas, A., Kahan, S., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A., and Oren, M. (2001). Deregulated beta-catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *The EMBO journal* 20, 4912-4922.
  110. Crescenzi, E., Palumbo, G., and Brady, H.J. (2003). Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *The Biochemical journal* 375, 263-274.
  111. Dimri, G.P., Itahana, K., Acosta, M., and Campisi, J. (2000). Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Molecular and cellular biology* 20, 273-285.
  112. Testa, J.R., and Bellacosa, A. (2001). AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10983-10985.
  113. Miyauchi, H., Minamino, T., Tateno, K., Kunieda, T., Toko, H., and Komuro, I. (2004). Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *The EMBO journal* 23, 212-220.
  114. Oyama, K., Okawa, T., Nakagawa, H., Takaoka, M., Andl, C.D., Kim, S.H., Klein-Szanto, A., Diehl, J.A., Herlyn, M., El-Deiry, W., et al. (2007). AKT induces senescence in primary esophageal epithelial cells but is permissive for differentiation as revealed in organotypic culture. *Oncogene* 26, 2353-2364.
  115. Kortlever, R.M., Higgins, P.J., and Bernards, R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nature cell biology* 8, 877-884.

116. Collado, M., Medema, R.H., Garcia-Cao, I., Dubuisson, M.L., Barradas, M., Glassford, J., Rivas, C., Burgering, B.M., Serrano, M., and Lam, E.W. (2000). Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *The Journal of biological chemistry* 275, 21960-21968.
117. Kipling, D., and Cooke, H.J. (1990). Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347, 400-402.
118. Loo, D.T., Fuquay, J.I., Rawson, C.L., and Barnes, D.W. (1987). Extended culture of mouse embryo cells without senescence: inhibition by serum. *Science* 236, 200-202.
119. Woo, R.A., and Poon, R.Y. (2004). Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes & development* 18, 1317-1330.
120. Ramirez, R.D., Morales, C.P., Herbert, B.S., Rohde, J.M., Passons, C., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes & development* 15, 398-403.
121. Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature cell biology* 5, 741-747.
122. Packer, L., and Fuehr, K. (1977). Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* 267, 423-425.
123. Balin, A.K., Goodman, B.P., Rasmussen, H., and Cristofalo, V.J. (1976). The effect of oxygen tension on the growth and metabolism of WI-38 cells. *Journal of cellular physiology* 89, 235-249.
124. Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J., and Ames, B.N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4337-4341.
125. Chen, Q., and Ames, B.N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 4130-4134.
126. Chainiaux, F., Magalhaes, J.P., Eliaers, F., Remacle, J., and Toussaint, O. (2002). UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34, 1331-1339.
127. de Magalhaes, J.P., Chainiaux, F., Remacle, J., and Toussaint, O. (2002). Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS letters* 523, 157-162.
128. Mirzayans, R., Scott, A., Cameron, M., and Murray, D. (2005). Induction of accelerated senescence by gamma radiation in human solid tumor-derived cell lines expressing wild-type TP53. *Radiation research* 163, 53-62.
129. Chang, B.D., Broude, E.V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E.S., Lausch, E., Christov, K., and Roninson, I.B. (1999). A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* 59, 3761-3767.



130. te Poele, R.H., Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S.P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer research* 62, 1876-1883.
131. Elmore, L.W., Rehder, C.W., Di, X., McChesney, P.A., Jackson-Cook, C.K., Gewirtz, D.A., and Holt, S.E. (2002). Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *The Journal of biological chemistry* 277, 35509-35515.
132. Wang, X., Wong, S.C., Pan, J., Tsao, S.W., Fung, K.H., Kwong, D.L., Sham, J.S., and Nicholls, J.M. (1998). Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer research* 58, 5019-5022.
133. Robles, S.J., and Adami, G.R. (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16, 1113-1123.
134. Yeo, E.J., Hwang, Y.C., Kang, C.M., Kim, I.H., Kim, D.I., Parka, J.S., Choy, H.E., Park, W.Y., and Park, S.C. (2000). Senescence-like changes induced by hydroxyurea in human diploid fibroblasts. *Experimental gerontology* 35, 553-571.
135. Park, J.I., Jeong, J.S., Han, J.Y., Kim, D.I., Gao, Y.H., Park, S.C., Rodgers, G.P., and Kim, I.H. (2000). Hydroxyurea induces a senescence-like change of K562 human erythroleukemia cell. *Journal of cancer research and clinical oncology* 126, 455-460.
136. Macip, S., Igarashi, M., Fang, L., Chen, A., Pan, Z.Q., Lee, S.W., and Aaronson, S.A. (2002). Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *The EMBO journal* 21, 2180-2188.
137. Lee, A.C., Fenster, B.E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N.S., Hirai, T., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Howard, B.H., and Finkel, T. (1999). Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* 274, 7936-7940.
138. Catalano, A., Rodilossi, S., Caprari, P., Coppola, V., and Procopio, A. (2005). 5-Lipoxygenase regulates senescence-like growth arrest by promoting ROS-dependent p53 activation. *EMBO J* 24, 170-179.
139. Blander, G., de Oliveira, R.M., Conboy, C.M., Haigis, M., and Guarente, L. (2003). Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem* 278, 38966-38969.
140. Wu, C., Miloslavskaya, I., Demontis, S., Maestro, R., and Galaktionov, K. (2004). Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. *Nature* 432, 640-645.
141. Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604.
142. Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Jr., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., Tainsky, M.A., et al. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science (New York, N.Y)* 250, 1233-1238.

143. Srivastava, S., Zou, Z.Q., Pirollo, K., Blattner, W., and Chang, E.H. (1990). Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348, 747-749.
144. Bourdon, J.C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K., and Lane, D.P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development* 19, 2122-2137.
145. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* (New York, N.Y. 265, 346-355.
146. Friedman, P.N., Chen, X., Bargonetti, J., and Prives, C. (1993). The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 3319-3323.
147. Clore, G.M., Omichinski, J.G., Sakaguchi, K., Zambrano, N., Sakamoto, H., Appella, E., and Gronenborn, A.M. (1994). High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. *Science* (New York, N.Y. 265, 386-391.
148. Toledo, F., and Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6, 909-923.
149. Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J., and Pavletich, N.P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* (New York, N.Y. 274, 948-953.
150. Schon, O., Friedler, A., Bycroft, M., Freund, S.M., and Fersht, A.R. (2002). Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *Journal of molecular biology* 323, 491-501.
151. Zacchi, P., Gostissa, M., Uchida, T., Salvagno, C., Avolio, F., Volinia, S., Ronai, Z., Blandino, G., Schneider, C., and Del Sal, G. (2002). The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* 419, 853-857.
152. Zheng, H., You, H., Zhou, X.Z., Murray, S.A., Uchida, T., Wulf, G., Gu, L., Tang, X., Lu, K.P., and Xiao, Z.X. (2002). The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* 419, 849-853.
153. Gu, W., Shi, X.L., and Roeder, R.G. (1997). Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* 387, 819-823.
154. Lill, N.L., Grossman, S.R., Ginsberg, D., DeCaprio, J., and Livingston, D.M. (1997). Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* 387, 823-827.
155. Avantaggiati, M.L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A.S., and Kelly, K. (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* 89, 1175-1184.
156. Scolnick, D.M., Chehab, N.H., Stavridi, E.S., Lien, M.C., Caruso, L., Moran, E., Berger, S.L., and Halazonetis, T.D. (1997). CREB-binding protein and p300/CBP-

- associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer research* 57, 3693-3696.
157. Webley, K., Bond, J.A., Jones, C.J., Blaydes, J.P., Craig, A., Hupp, T., and Wynford-Thomas, D. (2000). Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Molecular and cellular biology* 20, 2803-2808.
  158. She, Q.B., Chen, N., and Dong, Z. (2000). ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *The Journal of biological chemistry* 275, 20444-20449.
  159. Lees-Miller, S.P., Sakaguchi, K., Ullrich, S.J., Appella, E., and Anderson, C.W. (1992). Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Molecular and cellular biology* 12, 5041-5049.
  160. Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C., and Abraham, R.T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes & development* 13, 152-157.
  161. Gu, W., and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.
  162. Li, M., Luo, J., Brooks, C.L., and Gu, W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *The Journal of biological chemistry* 277, 50607-50611.
  163. Wang, Y.H., Tsay, Y.G., Tan, B.C., Lo, W.Y., and Lee, S.C. (2003). Identification and characterization of a novel p300-mediated p53 acetylation site, lysine 305. *The Journal of biological chemistry* 278, 25568-25576.
  164. Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W., and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & development* 12, 2831-2841.
  165. Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P., et al. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207-210.
  166. Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S., and Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378, 203-206.
  167. Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A., and Bradley, A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378, 206-208.
  168. Oliner, J.D., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362, 857-860.
  169. Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.

170. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.
171. Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS letters* 420, 25-27.
172. Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X., and Ronai, Z. (1998). Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene* 17, 2543-2547.
173. Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., and Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
174. Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H., and Weissman, A.M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *The Journal of biological chemistry* 275, 8945-8951.
175. Boyd, S.D., Tsai, K.Y., and Jacks, T. (2000). An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nature cell biology* 2, 563-568.
176. Geyer, R.K., Yu, Z.K., and Maki, C.G. (2000). The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nature cell biology* 2, 569-573.
177. Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., and Gu, W. (2003). Mono-versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science (New York, N.Y)* 302, 1972-1975.
178. Xirodimas, D.P., Saville, M.K., Bourdon, J.C., Hay, R.T., and Lane, D.P. (2004). Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* 118, 83-97.
179. Linares, L.K., Hengstermann, A., Ciechanover, A., Muller, S., and Scheffner, M. (2003). HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12009-12014.
180. Migliorini, D., Lazzerini Denchi, E., Danovi, D., Jochemsen, A., Capillo, M., Gobbi, A., Helin, K., Pelicci, P.G., and Marine, J.C. (2002). Mdm4 (Mdmx) regulates p53-induced growth arrest and neuronal cell death during early embryonic mouse development. *Molecular and cellular biology* 22, 5527-5538.
181. Finch, R.A., Donoviel, D.B., Potter, D., Shi, M., Fan, A., Freed, D.D., Wang, C.Y., Zambrowicz, B.P., Ramirez-Solis, R., Sands, A.T., et al. (2002). mdmx is a negative regulator of p53 activity in vivo. *Cancer research* 62, 3221-3225.
182. Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G.D., Dowd, P., O'Rourke, K., Koeppen, H., and Dixit, V.M. (2004). The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* 429, 86-92.
183. Leng, R.P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., Parant, J.M., Lozano, G., Hakem, R., and Benchimol, S. (2003). Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* 112, 779-791.
184. Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J., and Gu, W. (2005). ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121, 1071-1083.

185. Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *The EMBO journal* 12, 461-468.
186. Sui, G., Affar el, B., Shi, Y., Brignone, C., Wall, N.R., Yin, P., Donohoe, M., Luke, M.P., Calvo, D., Grossman, S.R., et al. (2004). Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell* 117, 859-872.
187. Higashitsuji, H., Higashitsuji, H., Itoh, K., Sakurai, T., Nagao, T., Sumitomo, Y., Masuda, T., Dawson, S., Shimada, Y., Mayer, R.J., et al. (2005). The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53. *Cancer cell* 8, 75-87.
188. Roe, J.S., Kim, H., Lee, S.M., Kim, S.T., Cho, E.J., and Youn, H.D. (2006). p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Molecular cell* 22, 395-405.
189. Garkavtsev, I., Grigorian, I.A., Ossovskaya, V.S., Chernov, M.V., Chumakov, P.M., and Gudkov, A.V. (1998). The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature* 391, 295-298.
190. Garkavtsev, I., and Riabowol, K. (1997). Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33ING1 candidate tumor suppressor. *Molecular and cellular biology* 17, 2014-2019.
191. Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W.G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppressor pathways. *Cell* 92, 725-734.
192. Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., et al. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19<sup>Arf</sup>, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 725-734.
193. Stott, F.J., Bates, S., James, M.C., McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K.H., et al. (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* 17, 5001-5014.
194. Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8292-8297.
195. Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat. Cell. Biol.* 1, 20-26.
196. Lin, A.W., and Lowe, S.W. (2001). Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 5025-5030.
197. Llanos, S., Clark, P.A., Rowe, J., and Peters, G. (2001). Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus. *Nature cell biology* 3, 445-452.

198. Honda, R., and Yasuda, H. (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *The EMBO journal* 18, 22-27.
199. Midgley, C.A., Desterro, J.M., Saville, M.K., Howard, S., Sparks, A., Hay, R.T., and Lane, D.P. (2000). An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo. *Oncogene* 19, 2312-2323.
200. Olson, M.O., Wallace, M.O., Herrera, A.H., Marshall-Carlson, L., and Hunt, R.C. (1986). Preribosomal ribonucleoprotein particles are a major component of a nucleolar matrix fraction. *Biochemistry* 25, 484-491.
201. Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M., and Nigg, E.A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56, 379-390.
202. Bertwistle, D., Sugimoto, M., and Sherr, C.J. (2004). Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Molecular and cellular biology* 24, 985-996.
203. Colombo, E., Bonetti, P., Lazzerini Denchi, E., Martinelli, P., Zamponi, R., Marine, J.C., Helin, K., Falini, B., and Pelicci, P.G. (2005). Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Molecular and cellular biology* 25, 8874-8886.
204. Kuo, M.L., den Besten, W., Bertwistle, D., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (2004). N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes & development* 18, 1862-1874.
205. Korgaonkar, C., Hagen, J., Tompkins, V., Frazier, A.A., Allamargot, C., Quelle, F.W., and Quelle, D.E. (2005). Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Molecular and cellular biology* 25, 1258-1271.
206. Colombo, E., Marine, J.C., Danovi, D., Falini, B., and Pelicci, P.G. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nature cell biology* 4, 529-533.
207. Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T.M., Ojala, P.M., Meek, D., and Laiho, M. (2004). Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer cell* 5, 465-475.
208. Lohrum, M.A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M., and Vousden, K.H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer cell* 3, 577-587.
209. Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K., and Zhang, Y. (2004). Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Molecular and cellular biology* 24, 7669-7680.
210. Phan, R.T., and Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432, 635-639.
211. Shvarts, A., Brummelkamp, T.R., Scheeren, F., Koh, E., Daley, G.Q., Spits, H., and Bernards, R. (2002). A senescence rescue screen identifies BCL6 as an inhibitor of anti-proliferative p19(ARF)-p53 signaling. *Genes & development* 16, 681-686.

212. Rowland, B.D., Bernards, R., and Peeper, D.S. (2005). The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nature cell biology* 7, 1074-1082.
213. Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-347.
214. Sugrue, M.M., Shin, D.Y., Lee, S.W., and Aaronson, S.A. (1997). Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9648-9653.
215. Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656-660.
216. Martins, C.P., Brown-Swigart, L., and Evan, G.I. (2006). Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* 127, 1323-1334.
217. Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., and Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445, 661-665.
218. Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., et al. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science (New York, N.Y.)* 303, 844-848.
219. Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Lin, A.W., Querido, E., McCurrach, M.E., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2002). Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Molecular and cellular biology* 22, 3497-3508.
220. Atadja, P., Wong, H., Garkavtsev, I., Veillette, C., and Riabowol, K. (1995). Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8348-8352.
221. Bond, J., Haughton, M., Blaydes, J., Gire, V., Wynford-Thomas, D., and Wyllie, F. (1996). Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence. *Oncogene* 13, 2097-2104.
222. St Clair, S., Giono, L., Varmeh-Ziaie, S., Resnick-Silverman, L., Liu, W.J., Padi, A., Dastidar, J., DaCosta, A., Mattia, M., and Manfredi, J.J. (2004). DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Molecular cell* 16, 725-736.
223. Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., and Fornace, A.J., Jr. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71, 587-597.
224. Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular cell* 1, 3-11.

225. Ohki, R., Nemoto, J., Murasawa, H., Oda, E., Inazawa, J., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000). Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *The Journal of biological chemistry* 275, 22627-22630.
226. Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.
227. Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.
228. Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Mullaer, F., Bock, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., and Strasser, A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science (New York, N.Y)* 302, 1036-1038.
229. Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W.H., Tom, E., Mack, D.H., and Levine, A.J. (2000). Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes & development* 14, 981-993.
230. He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., et al. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*.
231. Smith, J.R. (1992). Inhibitors of DNA synthesis derived from senescent human diploid fibroblasts. *Experimental gerontology* 27, 409-412.
232. Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M., and Smith, J.R. (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Experimental cell research* 211, 90-98.
233. el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
234. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
235. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.
236. LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 11, 847-862.
237. Zhang, H., Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev.* 8, 1750-1758.
238. Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and Dulic, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2109-2117.
239. Brown, J.P., Wenyi, W., and Sedivy, J.M. (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277, 831-834.



240. Medcalf, A.S., Klein-Szanto, A.J., and Cristofalo, V.J. (1996). Expression of p21 is not required for senescence of human fibroblasts. *Cancer Res.* 56, 4582-4585.
241. Fang, L., Igarashi, M., Leung, J., Sugrue, M.M., Lee, S.W., and Aaronson, S.A. (1999). p21Waf1/Cip1/Sdi1 induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53. *Oncogene* 18, 2789-2797.
242. Wang, Y., Blandino, G., and Givol, D. (1999). Induced p21waf expression in H1299 cell line promotes cell senescence and protects against cytotoxic effect of radiation and doxorubicin. *Oncogene* 18, 2643-2649.
243. Chan, H.M., Narita, M., Lowe, S.W., and Livingston, D.M. (2005). The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 --> p21 senescence pathway. *Genes & development* 19, 196-201.
244. Pantoja, C., and Serrano, M. (1999). Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 18, 4974-4982.
245. Bond, J.A., Blaydes, J.P., Rowson, J., Haughton, M.F., Smith, J.R., Wynford-Thomas, D., and Wyllie, F.S. (1995). Mutant p53 rescues human diploid cells from senescence without inhibiting the induction of SD11/WAF1. *Cancer Res.* 55, 2404-2409.
246. Kunz, C., Pebler, S., Otte, J., and von der Ahe, D. (1995). Differential regulation of plasminogen activator and inhibitor gene transcription by the tumor suppressor p53. *Nucleic acids research* 23, 3710-3717.
247. Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & development* 12, 3499-3511.
248. de Stanchina, E., Querido, E., Narita, M., Davuluri, R.V., Pandolfi, P.P., Ferbeyre, G., and Lowe, S.W. (2004). PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Molecular cell* 13, 523-535.
249. Sharpless, N.E. (2005). INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutation research* 576, 22-38.
250. Kamb, A., Gruis, N.A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitgian, S.V., Stockert, E., Day, R.S., 3rd, Johnson, B.E., and Skolnick, M.H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science (New York, N.Y.)* 264, 436-440.
251. Nobori, T., Miura, K., Wu, D.J., Lois, A., Takabayashi, K., and Carson, D.A. (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368, 753-756.
252. Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.
253. Jen, J., Harper, J.W., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Papadopoulos, N., Markowitz, S., Willson, J.K., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1994). Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer research* 54, 6353-6358.

254. Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-707.
255. Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., Walker, G.J., Hayward, N., and Dracopoli, N.C. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nature genetics* 12, 97-99.
256. Hussussian, C.J., Struewing, J.P., Goldstein, A.M., Higgins, P.A., Ally, D.S., Sheahan, M.D., Clark, W.H., Jr., Tucker, M.A., and Dracopoli, N.C. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature genetics* 8, 15-21.
257. Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000.
258. Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., and DePinho, R.A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85, 27-37.
259. Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720-724.
260. Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T.J., Stinson, J.A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A.D., Peters, G., and Hara, E. (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* 409, 1067-1070.
261. Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.
262. Malumbres, M., Perez De Castro, I., Hernandez, M.I., Jimenez, M., Corral, T., and Pellicer, A. (2000). Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b). *Mol Cell Biol* 20, 2915-2925.
263. Groth, A., Weber, J.D., Willumsen, B.M., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (2000). Oncogenic Ras Induces p19ARF and Growth Arrest in Mouse Embryo Fibroblasts Lacking p21Cip1 and p27Kip1 without Activating Cyclin D- dependent Kinases. *J Biol Chem* 275, 27473-27480.
264. Palmero, I., Pantoja, C., and Serrano, M. (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 395, 125-126.
265. Inoue, K., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1999). Induction of ARF tumor suppressor gene expression and cell cycle arrest by transcription factor DMP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3993-3998.
266. Sreeramaneni, R., Chaudhry, A., McMahon, M., Sherr, C.J., and Inoue, K. (2005). Ras-Raf-Arf signaling critically depends on the Dmp1 transcription factor. *Molecular and cellular biology* 25, 220-232.

267. Gil, J., and Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 667-677.
268. Guney, I., Wu, S., and Sedivy, J.M. (2006). Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16(INK4a). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3645-3650.
269. Grandori, C., Wu, K.J., Fernandez, P., Ngouenet, C., Grim, J., Clurman, B.E., Moser, M.J., Oshima, J., Russell, D.W., Swisshelm, K., et al. (2003). Werner syndrome protein limits MYC-induced cellular senescence. *Genes Dev* 17, 1569-1574.
270. Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes & development* 12, 2424-2433.
271. Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., and Massague, J. (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nature cell biology* 3, 400-408.
272. Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., et al. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nature cell biology* 3, 392-399.
273. Warner, B.J., Blain, S.W., Seoane, J., and Massague, J. (1999). Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway. *Molecular and cellular biology* 19, 5913-5922.
274. de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Lowe, S.W. (1998). E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes & development* 12, 2434-2442.
275. Aslanian, A., Iaquinta, P.J., Verona, R., and Lees, J.A. (2004). Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. *Genes & development* 18, 1413-1422.
276. Komori, H., Enomoto, M., Nakamura, M., Iwanaga, R., and Ohtani, K. (2005). Distinct E2F-mediated transcriptional program regulates p14ARF gene expression. *The EMBO journal* 24, 3724-3736.
277. Kel, A.E., Kel-Margoulis, O.V., Farnham, P.J., Bartley, S.M., Wingender, E., and Zhang, M.Q. (2001). Computer-assisted identification of cell cycle-related genes: new targets for E2F transcription factors. *Journal of molecular biology* 309, 99-120.
278. Lomazzi, M., Moroni, M.C., Jensen, M.R., Frittoli, E., and Helin, K. (2002). Suppression of the p53- or pRB-mediated G1 checkpoint is required for E2F-induced S-phase entry. *Nature genetics* 31, 190-194.
279. DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L., and Nevins, J.R. (1997). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7245-7250.

280. Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124-125.
281. Rowland, B.D., Denissov, S.G., Douma, S., Stunnenberg, H.G., Bernards, R., and Peeper, D.S. (2002). E2F transcriptional repressor complexes are critical downstream targets of p19(ARF)/p53-induced proliferative arrest. *Cancer cell* 2, 55-65.
282. Robertson, K.D., and Jones, P.A. (1998). The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. *Molecular and cellular biology* 18, 6457-6473.
283. Alani, R.M., Young, A.Z., and Shifflett, C.B. (2001). Id1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of p16/Ink4a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7812-7816.
284. Maeda, T., Hobbs, R.M., Merghoub, T., Guernah, I., Zelent, A., Cordon-Cardo, C., Teruya-Feldstein, J., and Pandolfi, P.P. (2005). Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression. *Nature* 433, 278-285.
285. Lingbeek, M.E., Jacobs, J.J., and van Lohuizen, M. (2002). The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator. *The Journal of biological chemistry* 277, 26120-26127.
286. Brummelkamp, T.R., Körtlever, R.M., Lingbeek, M., Trettel, F., MacDonald, M.E., van Lohuizen, M., and Bernards, R. (2002). TBX-3, the gene mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence. *The Journal of biological chemistry* 277, 6567-6572.
287. Jacobs, J.J., Keblusek, P., Robanus-Maandag, E., Kristel, P., Lingbeek, M., Nederlof, P.M., van Welsem, T., van de Vijver, M.J., Koh, E.Y., Daley, G.Q., et al. (2000). Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nature genetics* 26, 291-299.
288. Gonzalez, S., Klatt, P., Delgado, S., Conde, E., Lopez-Rios, F., Sanchez-Cespedes, M., Mendez, J., Antequera, F., and Serrano, M. (2006). Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus. *Nature* 440, 702-706.
289. Haupt, Y., Alexander, W.S., Barri, G., Klinken, S.P., and Adams, J.M. (1991). Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell* 65, 753-763.
290. van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijen, B., Wientjens, E., van der Gulden, H., and Berns, A. (1991). Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65, 737-752.
291. Jacobs, J.J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A., and van Lohuizen, M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 397, 164-168.

292. Itahana, K., Zou, Y., Itahana, Y., Martinez, J.L., Beausejour, C., Jacobs, J.J., Van Lohuizen, M., Band, V., Campisi, J., and Dimri, G.P. (2003). Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Molecular and cellular biology* 23, 389-401.
293. Core, N., Joly, F., Boned, A., and Djabali, M. (2004). Disruption of E2F signaling suppresses the INK4a-induced proliferative defect in M33-deficient mice. *Oncogene* 23, 7660-7668.
294. Isono, K., Fujimura, Y., Shinga, J., Yamaki, M., J, O.W., Takihara, Y., Murahashi, Y., Takada, Y., Mizutani-Koseki, Y., and Koseki, H. (2005). Mammalian polyhomeotic homologues Phc2 and Phc1 act in synergy to mediate polycomb repression of Hox genes. *Molecular and cellular biology* 25, 6694-6706.
295. Voncken, J.W., Roelen, B.A., Roefs, M., de Vries, S., Verhoeven, E., Marino, S., Deschamps, J., and van Lohuizen, M. (2003). Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2468-2473.
296. Guo, W.J., Datta, S., Band, V., and Dimri, G.P. (2007). Mel-18, a polycomb group protein, regulates cell proliferation and senescence via transcriptional repression of Bmi-1 and c-Myc oncoproteins. *Molecular biology of the cell* 18, 536-546.
297. Gil, J., Bernard, D., Martinez, D., and Beach, D. (2004). Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nature cell biology* 6, 67-72.
298. Dietrich, N., Bracken, A.P., Trinh, E., Schjerling, C.K., Koseki, H., Rappsilber, J., Helin, K., and Hansen, K.H. (2007). Bypass of senescence by the polycomb group protein CBX8 through direct binding to the INK4A-ARF locus. *The EMBO journal* 26, 1637-1648.
299. Bracken, A.P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., Theilgaard-Monch, K., Minucci, S., Porse, B.T., Marine, J.C., et al. (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes & development* 21, 525-530.
300. Kamminga, L.M., Bystrykh, L.V., de Boer, A., Houwer, S., Douma, J., Weersing, E., Dontje, B., and de Haan, G. (2006). The Polycomb group gene Ezh2 prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood* 107, 2170-2179.
301. Kranc, K.R., Bamforth, S.D., Braganca, J., Norbury, C., van Lohuizen, M., and Bhattacharya, S. (2003). Transcriptional coactivator Cited2 induces Bmi1 and Mel18 and controls fibroblast proliferation via Ink4a/ARF. *Molecular and cellular biology* 23, 7658-7666.
302. Tang, X., Milyavsky, M., Shats, I., Erez, N., Goldfinger, N., and Rotter, V. (2004). Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene. *Oncogene* 23, 5759-5769.
303. Sun, L.Q., Lee, D.W., Zhang, Q., Xiao, W., Raabe, E.H., Meeker, A., Miao, D., Huso, D.L., and Arceci, R.J. (2004). Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, PASG. *Genes & development* 18, 1035-1046.

304. Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M., and Dryja, T.P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, 643-646.
305. Yee, A.S., Reichel, R., Kovesdi, I., and Nevins, J.R. (1987). Promoter interaction of the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multi-component complex. *The EMBO journal* 6, 2061-2068.
306. Stevens, C., and La Thangue, N.B. (2003). E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Archives of biochemistry and biophysics* 412, 157-169.
307. Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H.I., Sang, L., Chong, G.T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F.A., Field, S.J., et al. (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* 414, 457-462.
308. Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J., and Helin, K. (1996). Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Molecular and cellular biology* 16, 1047-1057.
309. Lindeman, G.J., Dagnino, L., Gaubatz, S., Xu, Y., Bronson, R.T., Warren, H.B., and Livingston, D.M. (1998). A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting. *Genes & development* 12, 1092-1098.
310. Humbert, P.O., Rogers, C., Ganiatsas, S., Landsberg, R.L., Trimarchi, J.M., Dandapani, S., Brugnara, C., Erdman, S., Schrenzel, M., Bronson, R.T., et al. (2000). E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Molecular cell* 6, 281-291.
311. Rempel, R.E., Saenz-Robles, M.T., Storms, R., Morham, S., Ishida, S., Engel, A., Jakoi, L., Melhem, M.F., Pipas, J.M., Smith, C., et al. (2000). Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. *Molecular cell* 6, 293-306.
312. Morkel, M., Wenkel, J., Bannister, A.J., Kouzarides, T., and Hagemeyer, C. (1997). An E2F-like repressor of transcription. *Nature* 390, 567-568.
313. de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R., and Leone, G. (2003). Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *The Journal of biological chemistry* 278, 42041-42049.
314. Gaubatz, S., Wood, J.G., and Livingston, D.M. (1998). Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9190-9195.
315. Flemington, E.K., Speck, S.H., and Kaelin, W.G., Jr. (1993). E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 6914-6918.

316. Helin, K., Harlow, E., and Fattaey, A. (1993). Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Molecular and cellular biology* 13, 6501-6508.
317. Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24, 2796-2809.
318. Guan, K.L., Jenkins, C.W., Li, Y., Nichols, M.A., Wu, X., O'Keefe, C.L., Matera, A.G., and Xiong, Y. (1994). Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes & development* 8, 2939-2952.
319. Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.Y., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Molecular and cellular biology* 15, 2672-2681.
320. Chan, F.K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D.N., and Winoto, A. (1995). Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Molecular and cellular biology* 15, 2682-2688.
321. Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P., and Massague, J. (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78, 59-66.
322. Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.
323. Lee, M.H., Reynisdottir, I., and Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes & development* 9, 639-649.
324. Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes & development* 9, 650-662.
325. Dannenberg, J.H., van Rossum, A., Schuijff, L., and te Riele, H. (2000). Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes & development* 14, 3051-3064.
326. Sage, J., Mulligan, G.J., Attardi, L.D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E., and Jacks, T. (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes & development* 14, 3037-3050.
327. Peeper, D.S., Dannenberg, J.H., Douma, S., te Riele, H., and Bernards, R. (2001). Escape from premature senescence is not sufficient for oncogenic transformation by Ras. *Nature cell biology* 3, 198-203.
328. Xu, H.J., Zhou, Y., Ji, W., Perng, G.S., Kruzelock, R., Kong, C.T., Bast, R.C., Mills, G.B., Li, J., and Hu, S.X. (1997). Reexpression of the retinoblastoma protein

- in tumor cells induces senescence and telomerase inhibition. *Oncogene* 15, 2589-2596.
329. Stein, G.H., Beeson, M., and Gordon, L. (1990). Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science* 249, 666-669.
  330. Stein, G.H., Drullinger, L.F., Robetorye, R.S., Pereira-Smith, O.M., and Smith, J.R. (1991). Senescent cells fail to express cdc2, cycA, and cycB in response to mitogen stimulation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 88, 11012-11016.
  331. Afshari, C.A., Vojta, P.J., Annab, L.A., Futreal, P.A., Willard, T.B., and Barrett, J.C. (1993). Investigation of the role of G1/S cell cycle mediators in cellular senescence. *Exp. Cell Res.* 209, 231-237.
  332. Lucibello, F.C., Sewing, A., Brusselbach, S., Burger, C., and Muller, R. (1993). Deregulation of cyclins D1 and E and suppression of cdk2 and cdk4 in senescent human fibroblasts. *Journal of cell science* 105 (Pt 1), 123-133.
  333. Maehara, K., Yamakoshi, K., Ohtani, N., Kubo, Y., Takahashi, A., Arase, S., Jones, N., and Hara, E. (2005). Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *The Journal of cell biology* 168, 553-560.
  334. Peeper, D.S., Shvarts, A., Brummelkamp, T., Douma, S., Koh, E.Y., Daley, G.Q., and Bernards, R. (2002). A functional screen identifies hDRIL1 as an oncogene that rescues RAS-induced senescence. *Nature cell biology* 4, 148-153.
  335. Funayama, R., Saito, M., Tanobe, H., and Ishikawa, F. (2006). Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *The Journal of cell biology* 175, 869-880.
  336. Zhang, R., Chen, W., and Adams, P.D. (2007). Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Molecular and cellular biology* 27, 2343-2358.
  337. Zhang, R., Poustovoitov, M.V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., et al. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8, 19-30.
  338. Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.
  339. Ye, X., Zerlanko, B., Zhang, R., Somaiah, N., Lipinski, M., Salomoni, P., and Adams, P.D. (2007). Definition of pRB- and p53-dependent and -independent steps in HIRA/ASF1a-mediated formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Molecular and cellular biology* 27, 2452-2465.
  340. Narita, M., Narita, M., Krizhanovsky, V., Nunez, S., Chicas, A., Hearn, S.A., Myers, M.P., and Lowe, S.W. (2006). A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 126, 503-514.
  341. Rastogi, S., Joshi, B., Dasgupta, P., Morris, M., Wright, K., and Chellappan, S. (2006). Prohibitin facilitates cellular senescence by recruiting specific corepressors to inhibit E2F target genes. *Molecular and cellular biology* 26, 4161-4171.



342. Xiao, Z.X., Chen, J., Levine, A.J., Modjtahedi, N., Xing, J., Sellers, W.R., and Livingston, D.M. (1995). Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 375, 694-698.
343. Sdek, P., Ying, H., Chang, D.L., Qiu, W., Zheng, H., Touitou, R., Allday, M.J., and Xiao, Z.X. (2005). MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein. *Molecular cell* 20, 699-708.
344. Krimpenfort, P., Quon, K.C., Mooi, W.J., Loonstra, A., and Berns, A. (2001). Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 413, 83-86.
345. Latres, E., Malumbres, M., Sotillo, R., Martin, J., Ortega, S., Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Cordon-Cardo, C., and Barbacid, M. (2000). Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *The EMBO journal* 19, 3496-3506.
346. Sharpless, N.E., Bardeesy, N., Lee, K.H., Carrasco, D., Castrillon, D.H., Aguirre, A.J., Wu, E.A., Horner, J.W., and DePinho, R.A. (2001). Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413, 86-91.
347. Sharpless, N.E., Ramsey, M.R., Balasubramanian, P., Castrillon, D.H., and DePinho, R.A. (2004). The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* 23, 379-385.
348. Uhrbom, L., Nister, M., and Westermarck, B. (1997). Induction of senescence in human malignant glioma cells by p16INK4a. *Oncogene* 15, 505-514.
349. Brookes, S., Rowe, J., Ruas, M., Llanos, S., Clark, P.A., Lomax, M., James, M.C., Vatcheva, R., Bates, S., Vousden, K.H., et al. (2002). INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *Embo J* 21, 2936-2945.
350. Wei, W., Hemmer, R.M., and Sedivy, J.M. (2001). Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 21, 6748-6757.
351. Voorhoeve, P.M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A.J., Stoop, H., Nagel, R., Liu, Y.P., van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A., et al. (2006). A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 124, 1169-1181.
352. Benanti, J.A., and Galloway, D.A. (2004). Normal human fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *Mol Cell Biol* 24, 2842-2852.
353. Dirac, A.M., and Bernards, R. (2003). Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *The Journal of biological chemistry* 278, 11731-11734.
354. Sage, J., Miller, A.L., Perez-Mancera, P.A., Wysocki, J.M., and Jacks, T. (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* 424, 223-228.
355. Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal* 22, 4212-4222.

356. Dai, C.Y., and Enders, G.H. (2000). p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene* 19, 1613-1622.
357. Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ide, T., Saya, H., and Hara, E. (2006). Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nature cell biology* 8, 1291-1297.
358. de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675-684.
359. Goddard, A.D., Borrow, J., Freemont, P.S., and Solomon, E. (1991). Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science (New York, N.Y)* 254, 1371-1374.
360. Kakizuka, A., Miller, W.H., Jr., Umesono, K., Warrell, R.P., Jr., Frankel, S.R., Murty, V.V., Dmitrovsky, E., and Evans, R.M. (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66, 663-674.
361. Borrow, J., Goddard, A.D., Sheer, D., and Solomon, E. (1990). Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science (New York, N.Y)* 249, 1577-1580.
362. de The, H., Chomienne, C., Lanotte, M., Degos, L., and Dejean, A. (1990). The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347, 558-561.
363. Pandolfi, P.P., Grignani, F., Alcalay, M., Mencarelli, A., Biondi, A., LoCoco, F., Grignani, F., and Pelicci, P.G. (1991). Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene* 6, 1285-1292.
364. Brown, D., Kogan, S., Lagasse, E., Weissman, I., Alcalay, M., Pelicci, P.G., Atwater, S., and Bishop, J.M. (1997). A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2551-2556.
365. Fagioli, M., Alcalay, M., Pandolfi, P.P., Venturini, L., Mencarelli, A., Simeone, A., Acampora, D., Grignani, F., and Pelicci, P.G. (1992). Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms. *Oncogene* 7, 1083-1091.
366. Dyck, J.A., Maul, G.G., Miller, W.H., Jr., Chen, J.D., Kakizuka, A., and Evans, R.M. (1994). A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 76, 333-343.
367. Flenghi, L., Fagioli, M., Tomassoni, L., Pileri, S., Gambacorta, M., Pacini, R., Grignani, F., Casini, T., Ferrucci, P.F., Martelli, M.F., et al. (1995). Characterization of a new monoclonal antibody (PG-M3) directed against the aminoterminal portion of the PML gene product: immunocytochemical evidence for

- high expression of PML proteins on activated macrophages, endothelial cells, and epithelia. *Blood* 85, 1871-1880.
368. Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P.S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223-7233.
  369. Condemine, W., Takahashi, Y., Zhu, J., Puvion-Dutilleul, F., Guegan, S., Janin, A., and de The, H. (2006). Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms. *Cancer Res* 66, 6192-6198.
  370. Saurin, A.J., Borden, K.L., Boddy, M.N., and Freemont, P.S. (1996). Does this have a familiar RING? *Trends in biochemical sciences* 21, 208-214.
  371. Kamura, T., Conrad, M.N., Yan, Q., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1999). The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2. *Genes & development* 13, 2928-2933.
  372. Kamura, T., Koepp, D.M., Conrad, M.N., Skowrya, D., Moreland, R.J., Iliopoulos, O., Lane, W.S., Kaelin, W.G., Jr., Elledge, S.J., Conaway, R.C., et al. (1999). Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science (New York, N.Y)* 284, 657-661.
  373. Joazeiro, C.A., Wing, S.S., Huang, H., Levenson, J.D., Hunter, T., and Liu, Y.C. (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science (New York, N.Y)* 286, 309-312.
  374. Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S.A., Katz, M., Tsygankov, A.Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., et al. (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Molecular cell* 4, 1029-1040.
  375. Yokouchi, M., Kondo, T., Houghton, A., Bartkiewicz, M., Horne, W.C., Zhang, H., Yoshimura, A., and Baron, R. (1999). Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and UbCH7. *The Journal of biological chemistry* 274, 31707-31712.
  376. Seeler, J.S., and Dejean, A. (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nature reviews* 4, 690-699.
  377. Cohen, N., Sharma, M., Kentsis, A., Perez, J.M., Strudwick, S., and Borden, K.L. (2001). PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *Embo J* 20, 4547-4559.
  378. Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de The, H., Hay, R.T., and Freemont, P.S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112 (Pt 3), 381-393.
  379. Borden, K.L., Boddy, M.N., Lally, J., O'Reilly, N.J., Martin, S., Howe, K., Solomon, E., and Freemont, P.S. (1995). The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML. *Embo J* 14, 1532-1541.
  380. Shen, T.H., Lin, H.K., Scaglioni, P.P., Yung, T.M., and Pandolfi, P.P. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Molecular cell* 24, 331-339.

381. Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A., and Pandolfi, P.P. (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95, 2748-2752.
382. Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., 3rd, and Maul, G.G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 147, 221-234.
383. Koken, M.H., Puvion-Dutilleul, F., Guillemain, M.C., Viron, A., Linares-Cruz, G., Stuurman, N., de Jong, L., Szosteki, C., Calvo, F., Chomienne, C., et al. (1994). The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *Embo J* 13, 1073-1083.
384. Weis, K., Rambaud, S., Lavau, C., Jansen, J., Carvalho, T., Carmo-Fonseca, M., Lamond, A., and Dejean, A. (1994). Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* 76, 345-356.
385. Koken, M.H., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M.K., Sobczak-Thepot, J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F., and de The, H. (1995). The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* 10, 1315-1324.
386. Chang, K.S., Fan, Y.H., Andreeff, M., Liu, J., and Mu, Z.M. (1995). The PML gene encodes a phosphoprotein associated with the nuclear matrix. *Blood* 85, 3646-3653.
387. Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honore, N., Doubekovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P.P., Puvion, E., Freemont, P., et al. (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med* 193, 1361-1371.
388. Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P.P., and Dejean, A. (2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* 9, 769-779.
389. Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H.P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E.T. (1998). Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem* 273, 26675-26682.
390. Negorev, D., and Maul, G.G. (2001). Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* 20, 7234-7242.
391. Trotman, L.C., Alimonti, A., Scaglioni, P.P., Koutcher, J.A., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2006). Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature* 441, 523-527.
392. Moller, A., Sirma, H., Hofmann, T.G., Rueffer, S., Klimczak, E., Droge, W., Will, H., and Schmitz, M.L. (2003). PML is required for homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2)-mediated p53 phosphorylation and cell cycle arrest but is dispensable for the formation of HIPK domains. *Cancer Res* 63, 4310-4314.

393. Yang, S., Jeong, J.H., Brown, A.L., Lee, C.H., Pandolfi, P.P., Chung, J.H., and Kim, M.K. (2006). Promyelocytic leukemia activates Chk2 by mediating Chk2 autophosphorylation. *J Biol Chem* 281, 26645-26654.
394. Khan, M.M., Nomura, T., Kim, H., Kaul, S.C., Wadhwa, R., Shinagawa, T., Ichikawa-Iwata, E., Zhong, S., Pandolfi, P.P., and Ishii, S. (2001). Role of PML and PML-RARalpha in Mad-mediated transcriptional repression. *Molecular cell* 7, 1233-1243.
395. Grotzinger, T., Sternsdorf, T., Jensen, K., and Will, H. (1996). Interferon-modulated expression of genes encoding the nuclear-dot-associated proteins Sp100 and promyelocytic leukemia protein (PML). *Eur J Biochem* 238, 554-560.
396. Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L.D., Solomon, E., and Freemont, P.S. (1996). PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* 13, 971-982.
397. Sternsdorf, T., Jensen, K., and Will, H. (1997). Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol* 139, 1621-1634.
398. Kamitani, T., Nguyen, H.P., Kito, K., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E.T. (1998). Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem* 273, 3117-3120.
399. LaMorte, V.J., Dyck, J.A., Ochs, R.L., and Evans, R.M. (1998). Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4991-4996.
400. Doucas, V., Tini, M., Egan, D.A., and Evans, R.M. (1999). Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2627-2632.
401. Boisvert, F.M., Hendzel, M.J., and Bazett-Jones, D.P. (2000). Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J Cell Biol* 148, 283-292.
402. Lain, S., Midgley, C., Sparks, A., Lane, E.B., and Lane, D.P. (1999). An inhibitor of nuclear export activates the p53 response and induces the localization of HDM2 and p53 to U1A-positive nuclear bodies associated with the PODs. *Exp Cell Res* 248, 457-472.
403. Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P.P., Will, H., Schneider, C., and Del Sal, G. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *Embo J* 19, 6185-6195.
404. Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W., and Pandolfi, P.P. (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 730-736.
405. Bernassola, F., Salomoni, P., Oberst, A., Di Como, C.J., Pagano, M., Melino, G., and Pandolfi, P.P. (2004). Ubiquitin-dependent degradation of p73 is inhibited by PML. *J Exp Med* 199, 1545-1557.

406. Kim, E.J., Park, J.S., and Um, S.J. (2003). Identification of Daxx interacting with p73, one of the p53 family, and its regulation of p53 activity by competitive interaction with PML. *Nucleic Acids Res* 31, 5356-5367.
407. Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D., and Pandolfi, P.P. (2000). Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med* 191, 631-640.
408. Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E.J., and Chen, J.D. (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Molecular and cellular biology* 20, 1784-1796.
409. Torii, S., Egan, D.A., Evans, R.A., and Reed, J.C. (1999). Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *Embo J* 18, 6037-6049.
410. Everett, R.D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M., and Parkinson, J. (1997). A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *Embo J* 16, 1519-1530.
411. Zhu, H., Wu, L., and Maki, C.G. (2003). MDM2 and promyelocytic leukemia antagonize each other through their direct interaction with p53. *J Biol Chem* 278, 49286-49292.
412. Kurki, S., Latonen, L., and Laiho, M. (2003). Cellular stress and DNA damage invoke temporally distinct Mdm2, p53 and PML complexes and damage-specific nuclear relocalization. *J Cell Sci* 116, 3917-3925.
413. Wei, X., Yu, Z.K., Ramalingam, A., Grossman, S.R., Yu, J.H., Bloch, D.B., and Maki, C.G. (2003). Physical and functional interactions between PML and MDM2. *J Biol Chem* 278, 29288-29297.
414. Bernardi, R., Scaglioni, P.P., Bergmann, S., Horn, H.F., Vousden, K.H., and Pandolfi, P.P. (2004). PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nature cell biology* 6, 665-672.
415. D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., et al. (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nature cell biology* 4, 11-19.
416. Hofmann, T.G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H., and Schmitz, M.L. (2002). Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nature cell biology* 4, 1-10.
417. Mallette, F.A., Goumard, S., Gaumont-Leclerc, M.F., Moiseeva, O., and Ferbeyre, G. (2004). Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene* 23, 91-99.
418. Alcalay, M., Tomassoni, L., Colombo, E., Stoldt, S., Grignani, F., Fagioli, M., Szekely, L., Helin, K., and Pelicci, P.G. (1998). The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Molecular and cellular biology* 18, 1084-1093.

419. Seeler, J.S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C., and Dejean, A. (1998). Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7316-7321.
420. Carbone, R., Botrugno, O.A., Ronzoni, S., Insinga, A., Di Croce, L., Pelicci, P.G., and Minucci, S. (2006). Recruitment of the histone methyltransferase SUV39H1 and its role in the oncogenic properties of the leukemia-associated PML-retinoic acid receptor fusion protein. *Molecular and cellular biology* 26, 1288-1296.
421. Cairo, S., De Falco, F., Pizzo, M., Salomoni, P., Pandolfi, P.P., and Meroni, G. (2005). PML interacts with Myc, and Myc target gene expression is altered in PML-null fibroblasts. *Oncogene* 24, 2195-2203.
422. Smith, K.P., Byron, M., O'Connell, B.C., Tam, R., Schorl, C., Guney, I., Hall, L.L., Agrawal, P., Sedivy, J.M., and Lawrence, J.B. (2004). c-Myc localization within the nucleus: evidence for association with the PML nuclear body. *J Cell Biochem* 93, 1282-1296.
423. Kentsis, A., Dwyer, E.C., Perez, J.M., Sharma, M., Chen, A., Pan, Z.Q., and Borden, K.L. (2001). The RING domains of the promyelocytic leukemia protein PML and the arenaviral protein Z repress translation by directly inhibiting translation initiation factor eIF4E. *J Mol Biol* 312, 609-623.
424. Lai, H.K., and Borden, K.L. (2000). The promyelocytic leukemia (PML) protein suppresses cyclin D1 protein production by altering the nuclear cytoplasmic distribution of cyclin D1 mRNA. *Oncogene* 19, 1623-1634.
425. Carbone, R., Pearson, M., Minucci, S., and Pelicci, P.G. (2002). PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene* 21, 1633-1640.
426. Lombard, D.B., and Guarente, L. (2000). Nijmegen breakage syndrome disease protein and MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres. *Cancer Res* 60, 2331-2334.
427. Yang, S., Kuo, C., Bisi, J.E., and Kim, M.K. (2002). PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nature cell biology* 4, 865-870.
428. Luciani, J.J., Depetris, D., Usson, Y., Metzler-Guillemain, C., Mignon-Ravix, C., Mitchell, M.J., Megarbane, A., Sarda, P., Sirma, H., Moncla, A., et al. (2006). PML nuclear bodies are highly organised DNA-protein structures with a function in heterochromatin remodelling at the G2 phase. *J Cell Sci* 119, 2518-2531.
429. Wu, G., Lee, W.H., and Chen, P.L. (2000). NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem* 275, 30618-30622.
430. Xu, Z.X., Timanova-Atanasova, A., Zhao, R.X., and Chang, K.S. (2003). PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. *Molecular and cellular biology* 23, 4247-4256.

431. Boisvert, F.M., Hendzel, M.J., Masson, J.Y., and Richard, S. (2005). Methylation of MRE11 regulates its nuclear compartmentalization. *Cell Cycle* 4, 981-989.
432. Bernardi, R., Guernah, I., Jin, D., Grisendi, S., Alimonti, A., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Simon, M.C., Rafii, S., and Pandolfi, P.P. (2006). PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* 442, 779-785.
433. Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., and Grosschedl, R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes & development* 15, 3088-3103.
434. Salomoni, P., and Pandolfi, P.P. (2002). The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108, 165-170.
435. Everett, R.D., and Chelbi-Alix, M.K. (2007). PML and PML nuclear bodies: Implications in antiviral defence. *Biochimie*.
436. Maul, G.G., Yu, E., Ishov, A.M., and Epstein, A.L. (1995). Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *Journal of cellular biochemistry* 59, 498-513.
437. Chan, J.Y., Li, L., Fan, Y.H., Mu, Z.M., Zhang, W.W., and Chang, K.S. (1997). Cell-cycle regulation of DNA damage-induced expression of the suppressor gene PML. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 640-646.
438. Stadler, M., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M.H., Venturini, L., Lee, C., Saib, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemain, M.C., Schindler, C., et al. (1995). Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* 11, 2565-2573.
439. Chelbi-Alix, M.K., Pelicano, L., Quignon, F., Koken, M.H., Venturini, L., Stadler, M., Pavlovic, J., Degos, L., and de The, H. (1995). Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia* 9, 2027-2033.
440. Lavau, C., Marchio, A., Fagioli, M., Jansen, J., Falini, B., Lebon, P., Grosveld, F., Pandolfi, P.P., Pelicci, P.G., and Dejean, A. (1995). The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene* 11, 871-876.
441. Moiseeva, O., Mallette, F.A., Mukhopadhyay, U.K., Moores, A., and Ferbeyre, G. (2006). DNA Damage Signaling and p53-dependent Senescence after Prolonged {beta}-Interferon Stimulation. *Molecular biology of the cell*.
442. Melnick, A., and Licht, J.D. (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93, 3167-3215.
443. Perez, A., Kastner, P., Sethi, S., Lutz, Y., Reibel, C., and Chambon, P. (1993). PMLRAR homodimers: distinct DNA binding properties and heteromeric interactions with RXR. *Embo J* 12, 3171-3182.
444. Lin, R.J., and Evans, R.M. (2000). Acquisition of oncogenic potential by RAR chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers. *Molecular cell* 5, 821-830.



445. Minucci, S., Maccarana, M., Cioce, M., De Luca, P., Gelmetti, V., Segalla, S., Di Croce, L., Giavara, S., Matteucci, C., Gobbi, A., et al. (2000). Oligomerization of RAR and AML1 transcription factors as a novel mechanism of oncogenic activation. *Molecular cell* 5, 811-820.
446. Labrecque, J., Allan, D., Chambon, P., Iscove, N.N., Lohnes, D., and Hoang, T. (1998). Impaired granulocytic differentiation in vitro in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors alpha1 and gamma. *Blood* 92, 607-615.
447. Kastner, P., Lawrence, H.J., Waltzinger, C., Ghyselinck, N.B., Chambon, P., and Chan, S. (2001). Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARalpha. *Blood* 97, 1314-1320.
448. Raelson, J.V., Nervi, C., Rosenauer, A., Benedetti, L., Monczak, Y., Pearson, M., Pelicci, P.G., and Miller, W.H., Jr. (1996). The PML/RAR alpha oncoprotein is a direct molecular target of retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 88, 2826-2832.
449. Yoshida, H., Kitamura, K., Tanaka, K., Omura, S., Miyazaki, T., Hachiya, T., Ohno, R., and Naoe, T. (1996). Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: possible role of the proteasome pathway. *Cancer Res* 56, 2945-2948.
450. Daniel, M.T., Koken, M., Romagne, O., Barbey, S., Bazarbachi, A., Stadler, M., Guillemain, M.C., Degos, L., Chomienne, C., and de The, H. (1993). PML protein expression in hematopoietic and acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 82, 1858-1867.
451. Rego, E.M., Wang, Z.G., Peruzzi, D., He, L.Z., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) protein in tumor suppression. *J Exp Med* 193, 521-529.
452. Zhang, P., Chin, W., Chow, L.T., Chan, A.S., Yim, A.P., Leung, S.F., Mok, T.S., Chang, K.S., Johnson, P.J., and Chan, J.Y. (2000). Lack of expression for the suppressor PML in human small cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 85, 599-605.
453. Gurrieri, C., Capodieci, P., Bernardi, R., Scaglioni, P.P., Nafa, K., Rush, L.J., Verbel, D.A., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2004). Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *J Natl Cancer Inst* 96, 269-279.
454. Scaglioni, P.P., Yung, T.M., Cai, L.F., Erdjument-Bromage, H., Kaufman, A.J., Singh, B., Teruya-Feldstein, J., Tempst, P., and Pandolfi, P.P. (2006). A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* 126, 269-283.
455. Ahn, M.J., Nason-Burchenal, K., Moasser, M.M., and Dmitrovsky, E. (1995). Growth suppression of acute promyelocytic leukemia cells having increased expression of the non-rearranged alleles: RAR alpha or PML. *Oncogene* 10, 2307-2314.

456. Liu, J.H., Mu, Z.M., and Chang, K.S. (1995). PML suppresses oncogenic transformation of NIH/3T3 cells by activated neu. *J Exp Med* 181, 1965-1973.
457. Mu, Z.M., Chin, K.V., Liu, J.H., Lozano, G., and Chang, K.S. (1994). PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia. *Molecular and cellular biology* 14, 6858-6867.
458. Le, X.F., Vallian, S., Mu, Z.M., Hung, M.C., and Chang, K.S. (1998). Recombinant PML adenovirus suppresses growth and tumorigenicity of human breast cancer cells by inducing G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Oncogene* 16, 1839-1849.
459. Mu, Z.M., Le, X.F., Vallian, S., Glassman, A.B., and Chang, K.S. (1997). Stable overexpression of PML alters regulation of cell cycle progression in HeLa cells. *Carcinogenesis* 18, 2063-2069.
460. He, D., Mu, Z.M., Le, X., Hsieh, J.T., Pong, R.C., Chung, L.W., and Chang, K.S. (1997). Adenovirus-mediated expression of PML suppresses growth and tumorigenicity of prostate cancer cells. *Cancer Res* 57, 1868-1872.
461. Kemp, C.J., Donehower, L.A., Bradley, A., and Balmain, A. (1993). Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell* 74, 813-822.
462. Wang, Z.G., Delva, L., Gaboli, M., Rivi, R., Giorgio, M., Cordon-Cardo, C., Grosveld, F., and Pandolfi, P.P. (1998). Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science (New York, N.Y.)* 279, 1547-1551.
463. Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews* 25, 581-611.
464. Jiang, W.Q., and Ringertz, N. (1997). Altered distribution of the promyelocytic leukemia-associated protein is associated with cellular senescence. *Cell Growth Differ* 8, 513-522.
465. Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P.G., and Dejean, A. (2002). Deconstructing PML-induced premature senescence. *Embo J* 21, 3358-3369.
466. Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U.M., Frye, R.A., Minucci, S., Pelicci, P.G., and Kouzarides, T. (2002). Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *The EMBO journal* 21, 2383-2396.
467. Everett, R.D., Earnshaw, W.C., Pluta, A.F., Sternsdorf, T., Ainsztein, A.M., Carmena, M., Ruchaud, S., Hsu, W.L., and Orr, A. (1999). A dynamic connection between centromeres and ND10 proteins. *J Cell Sci* 112 ( Pt 20), 3443-3454.
468. Tang, J., Qu, L.K., Zhang, J., Wang, W., Michaelson, J.S., Degenhardt, Y.Y., El-Deiry, W.S., and Yang, X. (2006). Critical role for Daxx in regulating Mdm2. *Nature cell biology* 8, 855-862.
469. Li, M., Brooks, C.L., Kon, N., and Gu, W. (2004). A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Molecular cell* 13, 879-886.
470. Cummins, J.M., Rago, C., Kohli, M., Kinzler, K.W., Lengauer, C., and Vogelstein, B. (2004). Tumour suppression: disruption of HAUSP gene stabilizes p53. *Nature* 428, 1 p following 486.

471. Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J., and Gu, W. (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416, 648-653.
472. Lim, S.K., Shin, J.M., Kim, Y.S., and Baek, K.H. (2004). Identification and characterization of murine mHAUSP encoding a deubiquitinating enzyme that regulates the status of p53 ubiquitination. *International journal of oncology* 24, 357-364.
473. Hu, M., Li, P., Li, M., Li, W., Yao, T., Wu, J.W., Gu, W., Cohen, R.E., and Shi, Y. (2002). Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell* 111, 1041-1054.
474. Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., and Mak, T.W. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287, 1824-1827.
475. Ahn, J., Urist, M., and Prives, C. (2003). Questioning the role of checkpoint kinase 2 in the p53 DNA damage response. *The Journal of biological chemistry* 278, 20480-20489.
476. Fang, W., Mori, T., and Cobrinik, D. (2002). Regulation of PML-dependent transcriptional repression by pRB and low penetrance pRB mutants. *Oncogene* 21, 5557-5565.
477. Khan, M.M., Nomura, T., Kim, H., Kaul, S.C., Wadhwa, R., Zhong, S., Pandolfi, P.P., and Ishii, S. (2001). PML-RARalpha alleviates the transcriptional repression mediated by tumor suppressor Rb. *J Biol Chem* 276, 43491-43494.
478. Tokitou, F., Nomura, T., Khan, M.M., Kaul, S.C., Wadhwa, R., Yasukawa, T., Kohno, I., and Ishii, S. (1999). Viral ski inhibits retinoblastoma protein (Rb)-mediated transcriptional repression in a dominant negative fashion. *The Journal of biological chemistry* 274, 4485-4488.
479. Barr, S.M., Leung, C.G., Chang, E.E., and Cimprich, K.A. (2003). ATR kinase activity regulates the intranuclear translocation of ATR and RPA following ionizing radiation. *Curr Biol* 13, 1047-1051.
480. Zhong, S., Hu, P., Ye, T.Z., Stan, R., Ellis, N.A., and Pandolfi, P.P. (1999). A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene* 18, 7941-7947.
481. Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.
482. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* 73, 39-85.
483. Shiloh, Y. (1997). Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annual review of genetics* 31, 635-662.
484. Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., et al. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science (New York, N.Y)* 268, 1749-1753.

485. Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., et al. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science (New York, N.Y)* **281**, 1674-1677.
486. Smith, G.C., Cary, R.B., Lakin, N.D., Hann, B.C., Teo, S.H., Chen, D.J., and Jackson, S.P. (1999). Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 11134-11139.
487. Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506.
488. Pellegrini, M., Celeste, A., Difilippantonio, S., Guo, R., Wang, W., Feigenbaum, L., and Nussenzweig, A. (2006). Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation in vivo. *Nature* **443**, 222-225.
489. Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**, 605-611.
490. You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T., and Russell, P. (2005). ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* **25**, 5363-5379.
491. Kim, S.T., Xu, B., and Kastan, M.B. (2002). Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev* **16**, 560-570.
492. Lee, J.H., and Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science (New York, N.Y)* **308**, 551-554.
493. Lee, J.H., and Paull, T.T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science (New York, N.Y)* **304**, 93-96.
494. Cimprich, K.A., Shin, T.B., Keith, C.T., and Schreiber, S.L. (1996). cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 2850-2855.
495. Brown, E.J., and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes & development* **14**, 397-402.
496. de Klein, A., Muijtjens, M., van Os, R., Verhoeven, Y., Smit, B., Carr, A.M., Lehmann, A.R., and Hoeijmakers, J.H. (2000). Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* **10**, 479-482.
497. O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A., and Goodship, J.A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nature genetics* **33**, 497-501.
498. Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science (New York, N.Y)* **294**, 1713-1716.

499. Lim, D.S., Kim, S.T., Xu, B., Maser, R.S., Lin, J., Petrini, J.H., and Kastan, M.B. (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 404, 613-617.
500. Kitagawa, R., Bakkenist, C.J., McKinnon, P.J., and Kastan, M.B. (2004). Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* 18, 1423-1438.
501. Yazdi, P.T., Wang, Y., Zhao, S., Patel, N., Lee, E.Y., and Qin, J. (2002). SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes & development* 16, 571-582.
502. Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* 273, 5858-5868.
503. Cortez, D., Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 286, 1162-1166.
504. Tibbetts, R.S., Cortez, D., Brumbaugh, K.M., Scully, R., Livingston, D., Elledge, S.J., and Abraham, R.T. (2000). Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* 14, 2989-3002.
505. Riballo, E., Kuhne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G.C., Recio, M.J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., et al. (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell* 16, 715-724.
506. Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., et al. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922-927.
507. Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146, 905-916.
508. Celeste, A., Difilippantonio, S., Difilippantonio, M.J., Fernandez-Capetillo, O., Pilch, D.R., Sedelnikova, O.A., Eckhaus, M., Ried, T., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003). H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell* 114, 371-383.
509. Clapperton, J.A., Manke, I.A., Lowery, D.M., Ho, T., Haire, L.F., Yaffe, M.B., and Smerdon, S.J. (2004). Structure and mechanism of BRCA1 BRCT domain recognition of phosphorylated BACH1 with implications for cancer. *Nat Struct Mol Biol* 11, 512-518.
510. Manke, I.A., Lowery, D.M., Nguyen, A., and Yaffe, M.B. (2003). BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science* 302, 636-639.

511. Williams, R.S., Lee, M.S., Hau, D.D., and Glover, J.N. (2004). Structural basis of phosphopeptide recognition by the BRCT domain of BRCA1. *Nat Struct Mol Biol* 11, 519-525.
512. Yu, X., Chini, C.C., He, M., Mer, G., and Chen, J. (2003). The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* 302, 639-642.
513. Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M., and Elledge, S.J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961-966.
514. Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213-1226.
515. Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., et al. (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* 21, 187-200.
516. Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5, 675-679.
517. Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R.A., Jr., Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Petty, T.J., Sheston, E.A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S., and Halazonetis, T.D. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* 432, 406-411.
518. Ward, I.M., Minn, K., Jorda, K.G., and Chen, J. (2003). Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J Biol Chem* 278, 19579-19582.
519. Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Melander, F., Bartek, J., and Lukas, J. (2005). Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. *J Cell Biol* 170, 201-211.
520. Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S.J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277, 1497-1501.
521. Rhind, N., and Russell, P. (1998). Mitotic DNA damage and replication checkpoints in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 10, 749-758.
522. Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., and Elledge, S.J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10389-10394.
523. Zhao, H., and Piwnica-Worms, H. (2001). ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Molecular and cellular biology* 21, 4129-4139.

524. Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuasen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B.B., Bartek, J., et al. (2003). Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *The Journal of biological chemistry* 278, 14806-14811.
525. Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., et al. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14, 1448-1459.
526. Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y.A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., Nakanishi, M., and Nakayama, K. (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes & development* 14, 1439-1447.
527. Bell, D.W., Varley, J.M., Szydlo, T.E., Kang, D.H., Wahrer, D.C., Shannon, K.E., Lubratovich, M., Verselis, S.J., Isselbacher, K.J., Fraumeni, J.F., et al. (1999). Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science (New York, N.Y)* 286, 2528-2531.
528. Xu, X., Tsvetkov, L.M., and Stern, D.F. (2002). Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization. *Molecular and cellular biology* 22, 4419-4432.
529. Buscemi, G., Carlessi, L., Zannini, L., Lisanti, S., Fontanella, E., Canevari, S., and Delia, D. (2006). DNA damage-induced cell cycle regulation and function of novel Chk2 phosphoresidues. *Mol Cell Biol* 26, 7832-7845.
530. Buscemi, G., Perego, P., Carenini, N., Nakanishi, M., Chessa, L., Chen, J., Khanna, K., and Delia, D. (2004). Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. *Oncogene* 23, 7691-7700.
531. Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R.G., Bartek, J., and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410, 842-847.
532. Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 288, 1425-1429.
533. Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677-1679.
534. Siliciano, J.D., Canman, C.E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E., and Kastan, M.B. (1997). DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev* 11, 3471-3481.
535. Lambert, P.F., Kashanchi, F., Radonovich, M.F., Shiekhatter, R., and Brady, J.N. (1998). Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *The Journal of biological chemistry* 273, 33048-33053.

536. Dumaz, N., and Meek, D.W. (1999). Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *The EMBO journal* 18, 7002-7010.
537. Zhang, Y., and Xiong, Y. (2001). A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science (New York, N.Y)* 292, 1910-1915.
538. Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334.
539. Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T.D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* 14, 278-288.
540. Chehab, N.H., Malikzay, A., Stavridi, E.S., and Halazonetis, T.D. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13777-13782.
541. Maya, R., Balass, M., Kim, S.T., Shkedy, D., Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., et al. (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* 15, 1067-1077.
542. Chen, L., Gilkes, D.M., Pan, Y., Lane, W.S., and Chen, J. (2005). ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. *Embo J* 24, 3411-3422.
543. LeBron, C., Chen, L., Gilkes, D.M., and Chen, J. (2006). Regulation of MDMX nuclear import and degradation by Chk2 and 14-3-3. *Embo J* 25, 1196-1206.
544. Pan, Y., and Chen, J. (2003). MDM2 promotes ubiquitination and degradation of MDMX. *Mol Cell Biol* 23, 5113-5121.
545. Li, C., Chen, L., and Chen, J. (2002). DNA damage induces MDMX nuclear translocation by p53-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 22, 7562-7571.
546. Dornan, D., Shimizu, H., Mah, A., Dudhela, T., Eby, M., O'Rourke, K., Seshagiri, S., and Dixit, V.M. (2006). ATM engages autodegradation of the E3 ubiquitin ligase COP1 after DNA damage. *Science (New York, N.Y)* 313, 1122-1126.
547. Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N.B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nature cell biology* 5, 401-409.
548. Reinhardt, H.C., Aslanian, A.S., Lees, J.A., and Yaffe, M.B. (2007). p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer cell* 11, 175-189.
549. Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (1999). Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes & development* 13, 1067-1072.
550. d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.



- 551. Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular cell* 14, 501-513.
- 552. Bakkenist, C.J., Drissi, R., Wu, J., Kastan, M.B., and Dome, J.S. (2004). Disappearance of the telomere dysfunction-induced stress response in fully senescent cells. *Cancer Res* 64, 3748-3752.
- 553. Gire, V., Roux, P., Wynford-Thomas, D., Brondello, J.M., and Dulic, V. (2004). DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *The EMBO journal* 23, 2554-2563.
- 554. Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D., and Sedivy, J.M. (2006). Cellular senescence in aging primates. *Science (New York, N.Y.)* 311, 1257.
- 555. Hao, L.Y., Strong, M.A., and Greider, C.W. (2004). Phosphorylation of H2AX at short telomeres in T cells and fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 279, 45148-45154.
- 556. Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M., and Barrett, J.C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 6, 168-170.
- 557. Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science (New York, N.Y.)* 283, 1321-1325.
- 558. Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 13, 1549-1556.
- 559. Vaziri, H., West, M.D., Allsopp, R.C., Davison, T.S., Wu, Y.S., Arrowsmith, C.H., Poirier, G.G., and Benchimol, S. (1997). ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *The EMBO journal* 16, 6018-6033.
- 560. Metcalfe, J.A., Parkhill, J., Campbell, L., Stacey, M., Biggs, P., Byrd, P.J., and Taylor, A.M. (1996). Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia. *Nature genetics* 13, 350-353.
- 561. Wong, K.K., Maser, R.S., Bachoo, R.M., Menon, J., Carrasco, D.R., Gu, Y., Alt, F.W., and DePinho, R.A. (2003). Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature* 421, 643-648.
- 562. Karlseder, J., Hoke, K., Mirzoeva, O.K., Bakkenist, C., Kastan, M.B., Petrini, J.H., and de Lange, T. (2004). The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol* 2, E240.
- 563. Bradshaw, P.S., Stavropoulos, D.J., and Meyn, M.S. (2005). Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nature genetics* 37, 193-197.

564. Hockemeyer, D., Sfeir, A.J., Shay, J.W., Wright, W.E., and de Lange, T. (2005). POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end. *The EMBO journal* 24, 2667-2678.
565. Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U., and Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature reviews* 4, 712-720.
566. Vogel, H., Lim, D.S., Karsenty, G., Finegold, M., and Hasty, P. (1999). Deletion of Ku86 causes early onset of senescence in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 10770-10775.
567. Gu, Y., Seidl, K.J., Rathbun, G.A., Zhu, C., Manis, J.P., van der Stoep, N., Davidson, L., Cheng, H.L., Sekiguchi, J.M., Frank, K., et al. (1997). Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity* 7, 653-665.
568. Gao, Y., Sun, Y., Frank, K.M., Dikkes, P., Fujiwara, Y., Seidl, K.J., Sekiguchi, J.M., Rathbun, G.A., Swat, W., Wang, J., et al. (1998). A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell* 95, 891-902.
569. Frank, K.M., Sekiguchi, J.M., Seidl, K.J., Swat, W., Rathbun, G.A., Cheng, H.L., Davidson, L., Kangaloo, L., and Alt, F.W. (1998). Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature* 396, 173-177.
570. Hsu, H.L., Gilley, D., Blackburn, E.H., and Chen, D.J. (1999). Ku is associated with the telomere in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12454-12458.
571. d'Adda di Fagagna, F., Hande, M.P., Tong, W.M., Roth, D., Lansdorp, P.M., Wang, Z.Q., and Jackson, S.P. (2001). Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr Biol* 11, 1192-1196.
572. Hsu, H.L., Gilley, D., Galande, S.A., Hande, M.P., Allen, B., Kim, S.H., Li, G.C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T., and Chen, D.J. (2000). Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes & development* 14, 2807-2812.
573. Myung, K., Ghosh, G., Fattah, F.J., Li, G., Kim, H., Dutia, A., Pak, E., Smith, S., and Hendrickson, E.A. (2004). Regulation of telomere length and suppression of genomic instability in human somatic cells by Ku86. *Molecular and cellular biology* 24, 5050-5059.
574. Rooney, S., Alt, F.W., Lombard, D., Whitlow, S., Eckersdorff, M., Fleming, J., Fugmann, S., Ferguson, D.O., Schatz, D.G., and Sekiguchi, J. (2003). Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *The Journal of experimental medicine* 197, 553-565.
575. Espejel, S., Martin, M., Klatt, P., Martin-Caballero, J., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2004). Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs-deficient mice. *EMBO reports* 5, 503-509.

576. Espejel, S., Franco, S., Sgura, A., Gae, D., Bailey, S.M., Taccioli, G.E., and Blasco, M.A. (2002). Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance. *The EMBO journal* 21, 6275-6287.
577. Goytisolo, F.A., Samper, E., Edmonson, S., Taccioli, G.E., and Blasco, M.A. (2001). The absence of the dna-dependent protein kinase catalytic subunit in mice results in anaphase bridges and in increased telomeric fusions with normal telomere length and G-strand overhang. *Molecular and cellular biology* 21, 3642-3651.
578. Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D.M. (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265-275.
579. Cao, L., Li, W., Kim, S., Brodie, S.G., and Deng, C.X. (2003). Senescence, aging, and malignant transformation mediated by p53 in mice lacking the Brca1 full-length isoform. *Genes & development* 17, 201-213.
580. Mostoslavsky, R., Chua, K.F., Lombard, D.B., Pang, W.W., Fischer, M.R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M.M., et al. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124, 315-329.
581. Weeda, G., Donker, I., de Wit, J., Morreau, H., Janssens, R., Vissers, C.J., Nigg, A., van Steeg, H., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H. (1997). Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Curr Biol* 7, 427-439.
582. Yu, C.E., Oshima, J., Fu, Y.H., Wijsman, E.M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., et al. (1996). Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science (New York, N.Y)* 272, 258-262.
583. Lebel, M., and Leder, P. (1998). A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13097-13102.
584. Wyllie, F.S., Jones, C.J., Skinner, J.W., Haughton, M.F., Wallis, C., Wynford-Thomas, D., Faragher, R.G., and Kipling, D. (2000). Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts. *Nature genetics* 24, 16-17.
585. Chang, S., Multani, A.S., Cabrera, N.G., Naylor, M.L., Laud, P., Lombard, D., Pathak, S., Guarente, L., and DePinho, R.A. (2004). Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. *Nature genetics* 36, 877-882.
586. Opresko, P.L., Otterlei, M., Graakjaer, J., Bruheim, P., Dawut, L., Kolvraa, S., May, A., Seidman, M.M., and Bohr, V.A. (2004). The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Molecular cell* 14, 763-774.
587. Machwe, A., Xiao, L., and Orren, D.K. (2004). TRF2 recruits the Werner syndrome (WRN) exonuclease for processing of telomeric DNA. *Oncogene* 23, 149-156.
588. Shiratori, M., Sakamoto, S., Suzuki, N., Tokutake, Y., Kawabe, Y., Enomoto, T., Sugimoto, M., Goto, M., Matsumoto, T., and Furuichi, Y. (1999). Detection by

- epitope-defined monoclonal antibodies of Werner DNA helicases in the nucleoplasm and their upregulation by cell transformation and immortalization. *J Cell Biol* 144, 1-9.
589. Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R.M., and Lowe, S.W. (2002). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109, 335-346.
  590. Rebbaa, A., Zheng, X., Chou, P.M., and Mirkin, B.L. (2003). Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene* 22, 2805-2811.
  591. Choi, J., Shendrik, I., Peacocke, M., Peehl, D., Buttyan, R., Ikeguchi, E.F., Katz, A.E., and Benson, M.C. (2000). Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia. *Urology* 56, 160-166.
  592. Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725-730.
  593. Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665.
  594. Feldser, D.M., and Greider, C.W. (2007). Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer cell* 11, 461-469.
  595. Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474-2488.
  596. Sillaber, C., Gesbert, F., Frank, D.A., Sattler, M., and Griffin, J.D. (2000). STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood* 95, 2118-2125.
  597. Kato, Y., Iwama, A., Tadokoro, Y., Shimoda, K., Minoguchi, M., Akira, S., Tanaka, M., Miyajima, A., Kitamura, T., and Nakauchi, H. (2005). Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *The Journal of experimental medicine* 202, 169-179.
  598. Kazansky, A.V., Spencer, D.M., and Greenberg, N.M. (2003). Activation of signal transducer and activator of transcription 5 is required for progression of autochthonous prostate cancer: evidence from the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate system. *Cancer research* 63, 8757-8762.
  599. Li, H., Ahonen, T.J., Alanen, K., Xie, J., LeBaron, M.J., Pretlow, T.G., Ealley, E.L., Zhang, Y., Nurmi, M., Singh, B., et al. (2004). Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *Cancer research* 64, 4774-4782.
  600. Yamashita, H., and Iwase, H. (2002). The role of Stat5 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer* 9, 312-318.

601. Nevalainen, M.T., Xie, J., Torhorst, J., Bubendorf, L., Haas, P., Kononen, J., Sauter, G., and Rui, H. (2004). Signal transducer and activator of transcription-5 activation and breast cancer prognosis. *J Clin Oncol* 22, 2053-2060.
602. Xi, S., Zhang, Q., Gooding, W.E., Smithgall, T.E., and Grandis, J.R. (2003). Constitutive activation of Stat5b contributes to carcinogenesis in vivo. *Cancer research* 63, 6763-6771.
603. de Groot, R.P., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., and Koenderman, L. (2000). STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 3, 299-305.
604. Zindy, F., Williams, R.T., Baudino, T.A., Rehg, J.E., Skapek, S.X., Cleveland, J.L., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (2003). Arf tumor suppressor promoter monitors latent oncogenic signals in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15930-15935.
605. Bischof, O., Nacerddine, K., and Dejean, A. (2005). Human papillomavirus oncoprotein E7 targets the promyelocytic leukemia protein and circumvents cellular senescence via the Rb and p53 tumor suppressor pathways. *Molecular and cellular biology* 25, 1013-1024.
606. Mallette, F.A., Gaumont-Leclerc, M.F., and Ferbeyre, G. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes & development* 21, 43-48.
607. Jones, D.L., Alani, R.M., and Munger, K. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes & development* 11, 2101-2111.
608. Funk, J.O., Waga, S., Harry, J.B., Espling, E., Stillman, B., and Galloway, D.A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes & development* 11, 2090-2100.
609. Franco, E.L., Duarte-Franco, E., and Ferenczy, A. (2001). Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Cmaj* 164, 1017-1025.
610. Psyrris, A., DeFilippis, R.A., Edwards, A.P., Yates, K.E., Manuelidis, L., and DiMaio, D. (2004). Role of the retinoblastoma pathway in senescence triggered by repression of the human papillomavirus E7 protein in cervical carcinoma cells. *Cancer research* 64, 3079-3086.
611. Horner, S.M., DeFilippis, R.A., Manuelidis, L., and DiMaio, D. (2004). Repression of the human papillomavirus E6 gene initiates p53-dependent, telomerase-independent senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *Journal of virology* 78, 4063-4073.
612. Cicchillitti, L., Fasanaro, P., Biglioli, P., Capogrossi, M.C., and Martelli, F. (2003). Oxidative stress induces protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of

- the pocket proteins pRb, p107, and p130. *The Journal of biological chemistry* 278, 19509-19517.
613. Buschbeck, M., Uribesalzo, I., Ledl, A., Gutierrez, A., Minucci, S., Muller, S., and Di Croce, L. (2006). PML4 induces differentiation by Myc destabilization. *Oncogene*.
  614. Feng, X.H., Liang, Y.Y., Liang, M., Zhai, W., and Lin, X. (2002). Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). *Molecular cell* 9, 133-143.
  615. Rane, S.G., Dubus, P., Mettus, R.V., Galbreath, E.J., Boden, G., Reddy, E.P., and Barbacid, M. (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nature genetics* 22, 44-52.
  616. Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., and Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118, 493-504.
  617. Tsutsui, T., Hesabi, B., Moons, D.S., Pandolfi, P.P., Hansel, K.S., Koff, A., and Kiyokawa, H. (1999). Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity. *Molecular and cellular biology* 19, 7011-7019.
  618. Zou, X., Ray, D., Aziyu, A., Christov, K., Boiko, A.D., Gudkov, A.V., and Kiyokawa, H. (2002). Cdk4 disruption renders primary mouse cells resistant to oncogenic transformation, leading to Arf/p53-independent senescence. *Genes & development* 16, 2923-2934.
  619. Yu, Q., Sicinska, E., Geng, Y., Ahnstrom, M., Zagozdzon, A., Kong, Y., Gardner, H., Kiyokawa, H., Harris, L.N., Stal, O., et al. (2006). Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer. *Cancer cell* 9, 23-32.
  620. Ewen, M.E., Sluss, H.K., Whitehouse, L.L., and Livingston, D.M. (1993). TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 74, 1009-1020.
  621. Ewen, M.E., Oliver, C.J., Sluss, H.K., Miller, S.J., and Peeper, D.S. (1995). p53-dependent repression of CDK4 translation in TGF-beta-induced G1 cell-cycle arrest. *Genes & development* 9, 204-217.
  622. Fripiat, C., Chen, Q.M., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Remacle, J., and Toussaint, O. (2001). Subcytotoxic H2O2 stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 276, 2531-2537.
  623. Ju, B.G., Lunyak, V.V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2006). A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science (New York, N.Y)* 312, 1798-1802.
  624. Mason, D.X., Jackson, T.J., and Lin, A.W. (2004). Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene* 23, 9238-9246.
  625. Keogh, M.C., Kim, J.A., Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J.C., Onishi, M., Datta, N., Galicia, S., Emili, A., et al. (2006). A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* 439, 497-501.

626. Chowdhury, D., Keogh, M.C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S., and Lieberman, J. (2005). gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Molecular cell* 20, 801-809.
627. Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B., et al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434, 907-913.
628. Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434, 864-870.
629. DiTullio, R.A., Jr., Mochan, T.A., Venere, M., Bartkova, J., Sehested, M., Bartek, J., and Halazonetis, T.D. (2002). 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nature cell biology* 4, 998-1002.
630. Krebs, D.L., and Hilton, D.J. (2001). SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 19, 378-387.
631. Martino, A., Holmes, J.H.t., Lord, J.D., Moon, J.J., and Nelson, B.H. (2001). Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2. *J Immunol* 166, 1723-1729.
632. Monni, R., Santos, S.C., Mauchauffe, M., Berger, R., Ghysdael, J., Gouilleux, F., Gisselbrecht, S., Bernard, O., and Penard-Lacronique, V. (2001). The TEL-Jak2 oncoprotein induces Socs1 expression and altered cytokine response in Ba/F3 cells. *Oncogene* 20, 849-858.
633. Zhang, H., and Cohen, S.N. (2004). Smurf2 up-regulation activates telomere-dependent senescence. *Genes & development* 18, 3028-3040.
634. Lim, I.K., Won Hong, K., Kwak, I.H., Yoon, G., and Park, S.C. (2000). Cytoplasmic retention of p-Erk1/2 and nuclear accumulation of actin proteins during cellular senescence in human diploid fibroblasts. *Mechanisms of ageing and development* 119, 113-130.
635. Tresini, M., Lorenzini, A., Frisoni, L., Allen, R.G., and Cristofalo, V.J. (2001). Lack of Elk-1 phosphorylation and dysregulation of the extracellular regulated kinase signaling pathway in senescent human fibroblast. *Experimental cell research* 269, 287-300.
636. Gaumont-Leclerc, M.F., Mukhopadhyay, U.K., Goumard, S., and Ferbeyre, G. (2004). PEA-15 is inhibited by adenovirus E1A and plays a role in ERK nuclear export and Ras-induced senescence. *The Journal of biological chemistry* 279, 46802-46809.
637. Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., and Davis, R.J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science (New York, N.Y)* 267, 682-685.

638. Tanoue, T., Moriguchi, T., and Nishida, E. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. *The Journal of biological chemistry* 274, 19949-19956.
639. Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
640. Alt, J.R., Cleveland, J.L., Hannink, M., and Diehl, J.A. (2000). Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes & development* 14, 3102-3114.
641. Lin, D.I., Barbash, O., Kumar, K.G., Weber, J.D., Harper, J.W., Klein-Szanto, A.J., Rustgi, A., Fuchs, S.Y., and Diehl, J.A. (2006). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF(FBX4- $\alpha$ B crystallin) complex. *Molecular cell* 24, 355-366.
642. Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Hudson, D.F., Honda, R., Nigg, E.A., Gerloff, D.L., and Earnshaw, W.C. (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *The Journal of cell biology* 166, 179-191.
643. Li, F., Ackermann, E.J., Bennett, C.F., Rothermel, A.L., Plescia, J., Tognin, S., Villa, A., Marchisio, P.C., and Altieri, D.C. (1999). Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nature cell biology* 1, 461-466.
644. Petronczki, M., Glotzer, M., Kraut, N., and Peters, J.M. (2007). Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Developmental cell* 12, 713-725.
645. Rouse, J., and Jackson, S.P. (2002). Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science (New York, N.Y)* 297, 547-551.
646. Smith, A.N., Lovering, R.C., Futai, M., Takeda, J., Brown, D., and Karet, F.E. (2003). Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase subunit genes. *Molecular cell* 12, 801-803.
647. Martoriati, A., Doumont, G., Alcalay, M., Bellefroid, E., Pelicci, P.G., and Marine, J.C. (2005). *dapk1*, encoding an activator of a p19ARF-p53-mediated apoptotic checkpoint, is a transcription target of p53. *Oncogene* 24, 1461-1466.
648. Bliskovsky, V., Ramsay, E.S., Scott, J., DuBois, W., Shi, W., Zhang, S., Qian, X., Lowy, D.R., and Mock, B.A. (2003). Frap, FKBP12 rapamycin-associated protein, is a candidate gene for the plasmacytoma resistance locus Pctr2 and can act as a tumor suppressor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 14982-14987.
649. Stein, S., Thomas, E.K., Herzog, B., Westfall, M.D., Rocheleau, J.V., Jackson, R.S., 2nd, Wang, M., and Liang, P. (2004). NDRG1 is necessary for p53-dependent apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 48930-48940.
650. Maruyama, Y., Ono, M., Kawahara, A., Yokoyama, T., Basaki, Y., Kage, M., Aoyagi, S., Kinoshita, H., and Kuwano, M. (2006). Tumor growth suppression in



- pancreatic cancer by a putative metastasis suppressor gene Cap43/NDRG1/Drg-1 through modulation of angiogenesis. *Cancer research* 66, 6233-6242.
651. Wang, S., and El-Deiry, W.S. (2006). p73 or p53 directly regulates human p53 transcription to maintain cell cycle checkpoints. *Cancer research* 66, 6982-6989.
  652. Deffie, A., Wu, H., Reinke, V., and Lozano, G. (1993). The tumor suppressor p53 regulates its own transcription. *Molecular and cellular biology* 13, 3415-3423.
  653. Karlsson, C., Afrakhte, M., Westermarck, B., and Paulsson, Y. (1999). Elevated level of gas3 gene expression is correlated with G0 growth arrest in human fibroblasts. *Cell Biol Int* 23, 351-358.
  654. Eggert, U.S., Mitchison, T.J., and Field, C.M. (2006). Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annual review of biochemistry* 75, 543-566.
  655. Kho, P.S., Wang, Z., Zhuang, L., Li, Y., Chew, J.L., Ng, H.H., Liu, E.T., and Yu, Q. (2004). p53-regulated transcriptional program associated with genotoxic stress-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 21183-21192.
  656. Kolfschoten, I.G., van Leeuwen, B., Berns, K., Mullenders, J., Beijersbergen, R.L., Bernards, R., Voorhoeve, P.M., and Agami, R. (2005). A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell* 121, 849-858.
  657. Westbrook, T.F., Martin, E.S., Schlabach, M.R., Leng, Y., Liang, A.C., Feng, B., Zhao, J.J., Roberts, T.M., Mandel, G., Hannon, G.J., et al. (2005). A genetic screen for candidate tumor suppressors identifies REST. *Cell* 121, 837-848.
  658. Paddison, P.J., Silva, J.M., Conklin, D.S., Schlabach, M., Li, M., Aruleba, S., Balija, V., O'Shaughnessy, A., Gnoj, L., Scobie, K., et al. (2004). A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature* 428, 427-431.
  659. Cosme-Blanco, W., Shen, M.F., Lazar, A.J., Pathak, S., Lozano, G., Multani, A.S., and Chang, S. (2007). Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. *EMBO Rep* 8, 497-503.
  660. Liu, X., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., and Hennighausen, L. (1997). Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* 11, 179-186.
  661. Udy, G.B., Towers, R.P., Snell, R.G., Wilkins, R.J., Park, S.H., Ram, P.A., Waxman, D.J., and Davey, H.W. (1997). Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7239-7244.
  662. Yao, Z., Cui, Y., Watford, W.T., Bream, J.H., Yamaoka, K., Hissong, B.D., Li, D., Durum, S.K., Jiang, Q., Bhandoola, A., et al. (2006). Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1000-1005.
  663. Ho, J.M., Beattie, B.K., Squire, J.A., Frank, D.A., and Barber, D.L. (1999). Fusion of the ets transcription factor TEL to Jak2 results in constitutive Jak-Stat signaling. *Blood* 93, 4354-4364.
  664. Lacronique, V., Boureux, A., Valle, V.D., Poirel, H., Quang, C.T., Mauchauffe, M., Berthou, C., Lessard, M., Berger, R., Ghysdael, J., et al. (1997). A TEL-JAK2

- fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 278, 1309-1312.
665. Shuai, K., Halpern, J., ten Hoeve, J., Rao, X., and Sawyers, C.L. (1996). Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 13, 247-254.
  666. Schwaller, J., Parganas, E., Wang, D., Cain, D., Aster, J.C., Williams, I.R., Lee, C.K., Gerthner, R., Kitamura, T., Frantsve, J., et al. (2000). Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Mol Cell* 6, 693-704.
  667. de Groot, R.P., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Jove, R., and Koenderman, L. (1999). STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* 94, 1108-1112.
  668. Nieborowska-Skorska, M., Wasik, M.A., Slupianek, A., Salomoni, P., Kitamura, T., Calabretta, B., and Skorski, T. (1999). Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. *J Exp Med* 189, 1229-1242.
  669. Onishi, M., Nosaka, T., Misawa, K., Mui, A.L., Gorman, D., McMahon, M., Miyajima, A., and Kitamura, T. (1998). Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol Cell Biol* 18, 3871-3879.
  670. Matsumura, I., Kitamura, T., Wakao, H., Tanaka, H., Hashimoto, K., Albanese, C., Downward, J., Pestell, R.G., and Kanakura, Y. (1999). Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J* 18, 1367-1377.
  671. Wen, X., Lin, H.H., Shih, H.M., Kung, H.J., and Ann, D.K. (1999). Kinase activation of the non-receptor tyrosine kinase Etk/BMX alone is sufficient to transactivate STAT-mediated gene expression in salivary and lung epithelial cells. *J Biol Chem* 274, 38204-38210.
  672. Wang, S., Nath, N., Adlam, M., and Chellappan, S. (1999). Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene* 18, 3501-3510.
  673. Wang, S., Fusaro, G., Padmanabhan, J., and Chellappan, S.P. (2002). Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene* 21, 8388-8396.
  674. Wang, S., Zhang, B., and Faller, D.V. (2004). BRG1/BRM and prohibitin are required for growth suppression by estrogen antagonists. *EMBO J* 23, 2293-2303.
  675. Liu, K., Luo, Y., Lin, F.T., and Lin, W.C. (2004). TopBP1 recruits Brg1/Brm to repress E2F1-induced apoptosis, a novel pRb-independent and E2F1-specific control for cell survival. *Genes Dev* 18, 673-686.

## ANNEXES

### Annexe I : Matériel et méthodes des figures et tableaux présentés dans la discussion

#### Cellules et rétrovirus

Les fibroblastes diploïdes normaux humains IMR90 et les MEFs furent cultivés dans du DMEM supplémenté de 10 % de sérum foetal bovin et de 1% de pénicilline G/streptomycine. Les vecteurs rétroviraux utilisés sont pLPC, pBabeRasV12, pBabeSTAT5A1\*6, pLPC SOCS-1 (fourni par Dr Sylvain Meloche), pBabeSOCS-1 et pBabeSOCS-1Δbox (fourni par Dr I. Touw). L'infection des fibroblastes, l'analyse de la prolifération cellulaire, les essais SA-β-gal et les immunofluorescences furent effectués tel que décrit par Ferbeyre *et al.* [90].

#### Immunobuvardages

Afin de préparer les extraits cellulaires, les cellules furent trypsinisées, lavées avec du PBS, lysées dans 100 μL de tampon de lyse (60mM Tris-Hcl pH 6,8, 10% glycérol, 2% SDS et 5% β-mercaptoéthanol) puis bouillies pendant cinq minutes. Pour effectuer les immunobuvardages, 20 μg de protéines furent séparées par SDS-PAGE puis transférées sur des membranes Immobilon-P (Millipore). Les anticorps primaires utilisés furent : anti-Rb (G3-245, 1:250, BD Pharmingen), anti-p16<sup>INK4a</sup> (F-12, 1:500, Santa Cruz), anti-CDK4 (C-22, 1:250, Santa Cruz), anti-Mcm6 (fourni par Dr Heidebrecht, 1:10), anti-p53 (9282, 1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-p53<sup>S15</sup> (16G8, 1:2000, Cell Signaling), anti-p21 (C-19, 1:750, Santa Cruz), anti-Myc (9E10, 1:2500), anti-tubuline (B-5-1-2, 1:5000, Sigma), anti-PML (PGM3, 1:200, Santa Cruz), anti-phospho-ATM<sup>S1981</sup> (10H11.E12, 1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-Chk2<sup>T68</sup> (2661, 1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-Chk2<sup>S19</sup> (2666, 1:1000, Cell Signaling) et anti-Chk2 (2662, 1:1000, Cell Signaling). Les signaux

furent révélés après incubation avec des anticorps secondaires couplés à la peroxidase (Amersham) en utilisant les substrats ECL (Amersham) ou Lumi-Light<sup>PLUS</sup> (Roche).

### **Analyse de l'ARN**

Le buvardage de type *Northern* fut effectué à partir d'ARN total purifié par Ultraspec (Biotecx Labs, Texas) six jours après la fin de la sélection de cellules IMR90 infectées avec le vecteur contrôle, RasV12 ou STAT5A1\*6. 20 µg d'ARN total furent séparés sur un gel d'agarose (1,2 %) contenant du formaldéhyde puis transférés sur une membrane de nylon Hybond-N (Amersham) dans du tampon 20X SSC (3M NaCl, 0,3M citrate de sodium pH 7,0 et 2 % SDS). L'hybridation avec une sonde complémentaire à SOCS-1 marquée au <sup>32</sup>P par amorces aléatoires (Amersham) fut réalisée dans 7 % SDS, 0,25M de tampon phosphate pH 7,4, 1 % BSA et 1mM EDTA. La membrane fut par la suite lavée deux fois à 65°C avec du 2X SSC pendant dix minutes puis avec du 0,2X SSC pendant 30 minutes.

Pour l'analyse du profil d'expression génique, les micropuces U133 couvrant le génome humain (Affymetrix) furent utilisées afin de comparer les niveaux d'ARNm dans les IMR90 infectés par pBabe ou pBabeSTAT5A1\*6 huit jours après la sélection.

Pour l'analyse du profil d'expression des gènes régulés par p53, la micropuce Oligo GEArray<sup>®</sup> human p53 signaling pathway microarray (SuperArray Bioscience) fut utilisée.

## **Annexe II : Liste des contributions de l'auteur à d'autres articles que ceux inclus dans cette thèse**

1. Moiseeva, O., Mallette, F.A., Mukhopadhyay, U.K., Moores, A., and Ferbeyre, G.  
DNA Damage Signaling and p53-dependent Senescence after Prolonged  $\beta$ -Interferon Stimulation.  
*Molecular Biology of the Cell* (2006) 17: 1583-1592.
2. Villiard, E., Brinkmann, H., Moiseeva, O., Mallette, F.A., Ferbeyre G., and Roy, S.  
Urodele p53 tolerates amino acid changes found in p53 variants linked to human cancer.  
Soumis à *BMC Evolutionary Biology* (2007).
3. Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Farhat, N., Villeneuve, L., Mamarbachi, A.M., Mallette, F.A., Ferbeyre, G., Perreault, L.P., Carrier, M., and Thorin, E.  
Antioxidant-dependent telomerase activation delays endothelial cell senescence from patients with coronary artery disease.  
Soumis à *American Journal of Physiology* (2007).

## Annexe III : Accord des coauteurs (article 1)

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

Frédéric Antoine Mallette

Ph.D. Biochimie

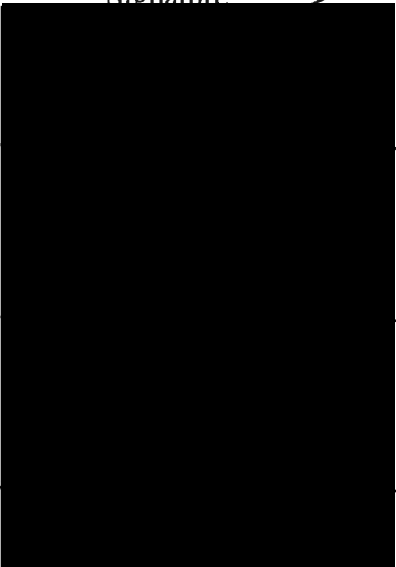
### 2. Description de l'article

Frédéric A. Mallette, Stéphane Goumard, Marie-France Gaumont-Leclerc, Olga Moiseeva et Gerardo Ferbeyre. (2004) Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene* **23**, 91-99.

### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de co-auteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Frédéric Antoine Mallette inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre *Mécanismes de suppression tumorale impliqués lors de la sénescence induite par les oncogènes*.

Stéphane Goumard

	Signature	Date
Marie-France Gaumont-Leclerc		27/6/7
		Date
Olga Moiseeva		27/6/7
		Date
Gerardo Ferbeyre		27/6/7
		Date

## Annexe IV : Accord des coauteurs (article 2)

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

Frédéric Antoine Mallette

Ph.D. Biochimie

### 2. Description de l'article

Frédéric A. Mallette, Marie-France Gaumont-Leclerc et Gerardo Ferbeyre. (2007)  
Regulation of the Rb pathway by CDK4 downregulation during STAT5-induced  
senescence. Cet article est en préparation pour soumission dans *Oncogene*.

### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Frédéric Antoine Mallette inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre *Mécanismes de suppression tumorale impliqués lors de la sénescence induite par les oncogènes*.

Marie-France Gaumont-Leclerc

27/6/07  
Date

Gerardo Ferbeyre

27/6/7  
Date

## Annexe V : Accord des coauteurs (article 3)

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

Frédéric Antoine Mallette

Ph.D. Biochimie

### 2. Description de l'article

Frédéric A. Mallette, Marie-France Gaumont-Leclerc et Gerardo Ferbeyre. (2007)  
DNA damage is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes & Development* **21**, 43-48.

### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Frédéric Antoine Mallette inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre *Mécanismes de suppression tumorale impliqués lors de la sénescence induite par les oncogènes*.

Marie-France Gaumont-Leclerc

27/6/7

Date

Gerardo Ferbeyre

27/6/7

Date



## Annexe VI : Accord des coauteurs (article 4)

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

Frédéric Antoine Mallette

Ph.D. Biochimie

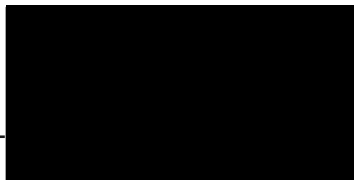
### 2. Description de l'article

Frédéric A. Mallette et Gerardo Ferbeyre. (2007) The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell cycle* 6, à paraître dans le numéro du 1<sup>er</sup> août 2007.

### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Frédéric Antoine Mallette inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre *Mécanismes de suppression tumorale impliqués lors de la sénescence induite par les oncogènes*.

Gerardo Ferbeyre



27/6/7

Date

## COPYRIGHT TRANSFER

Please select the Journal your copyright transfer is for:

☐ AUTOPHAGY ☐ CALCIUM BINDING PROTEINS ☐ CANCER BIOLOGY & THERAPY ☐ CELL ADHESION AND MIGRATION ☒ CELL CYCLE  
☐ CHANNELS ☐ EPIGENETICS ☐ FLY ☐ HUMAN VACCINES ☐ ORGANOGENESIS ☐ PLANT SIGNALING & BEHAVIOR ☐ PRION ☐ RNA BIOLOGY

**MANUSCRIPT NUMBER** The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence

**FIRST AUTHOR** Frédéric A. Mallette

### AGREEMENT

Agreement made on (date) 25 / 06 / 2007, between Landes Bioscience and: (print or type name below)

Frédéric A. Mallette

hereinafter Author, with respect to Author's written work provisionally titled: (print or type title below)

The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence

hereinafter the Contribution intended for publication in the journal title indicated at the top of this form, hereinafter referred to as the Journal.

Transfer of Copyright: Author transfers and assigns to Landes Bioscience all right, title, and interest of every kind in and to the copyright of the Contribution for the full term of copyright throughout the world, together with all exclusive rights comprised in such copyright and remedies as afforded by law (for United States Government employees, to the extent allowable by law), including, without limitation, the exclusive right: to register the copyright in the name of Landes Bioscience; to reproduce, publish, transmit, distribute, and publicly display and perform copies of the Contribution or excerpts therefrom, in any format or medium, and by any method, device, or process, now known or later conceived or developed; to prepare translations and other derivative works based on the Contribution; and to license, transfer, or assign to others any or all of the rights comprised in the copyright in the Contribution.

The publisher makes no guarantee that the Contribution will be published in the Journal. If, for any reason, the Contribution is not published in the Journal, all rights in the copyright in the Contribution shall revert to the Author, and this Transfer shall be of no further force and effect and neither Landes Bioscience/Eurekah.com or the Author will have any obligation to the other with respect to the Contribution.

License to Author: Landes Bioscience/Eurekah.com grant back to the Author the non-exclusive rights to (a) use of all or part of the Contribution (after publication in the Journal) in any book or article written by the Author(s) (including a PhD thesis or dissertation) and (b) make photocopies of all or part of the Contribution for use by the Author(s) in classroom teaching. As a condition for this license to the Author(s), all such books and articles containing the Contribution or any part thereof, and all photocopies of the Contribution or any part thereof, must include the copyright notice that appears on the issue of the Journal in which the Contribution is first published and a full citation of the Journal.

Author's Duties: (a) if the Contribution contains copyrighted material not owned by the Author, then the Author shall obtain written permission from the copyright owner, in a form acceptable to Landes Bioscience, to include such copyrighted material in the Contribution and to reprint it in the Journal, and shall deliver such written permission to Landes Bioscience together with delivery of the manuscript of the Contribution. (b) Landes Bioscience may copyedit the Contribution as necessary in order to prepare it for production and publication in the Journal. The Author will proofread and correct the edited manuscript, and, if forwarded, the proofs of the Contribution and shall return them in a timely manner as directed. If corrected proofs are not returned in a timely manner, Landes Bioscience may proceed with the publication of the Contribution as it deems appropriate. (c) This transfer must be signed by the Author and delivered to Landes Bioscience as a condition for publication of the Contribution in the Journal.

Warranties: The Author warrants and represents that (a) the Contribution has not been previously published, is not in the public domain, and is the original work of the Author(s) (except for excerpts from copyrighted material owned by others and included with the written permission of the copyright owner); (b) Author is the owner of all right, title, and interest of every kind in and to the copyright of the contribution, and has the full power, and authority to transfer and assign the copyright to the Publisher; (c) the Contribution does not infringe the copyright or any other proprietary right of any party; (d) the Contribution contains no material that is defamatory, violates any right of privacy, or is otherwise contrary to law; (e) all statements in the Contribution asserted as facts are based upon reasonable research for accuracy; and (f) no formula or procedure contained in the Contribution would cause injury if used in accordance with the instructions and/or warnings contained in the Contribution.

Author Signature

Landes Bioscience

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Jun 25, 2007

---

This is a License Agreement between Frédérick A Mallette ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

License Number	1736011045524
License date	Jun 25, 2007
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Oncogene
Licensed content title	Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-Induced senescence
Licensed content author	Frédérick A Mallette, Stéphane Goumard, Marie-France Gaumont-Leclerc, Olga Moiseeva, Gerardo ...
Volume number	23
Issue number	1
Pages	91-99
Year of publication	2004
Portion used	Full paper
Requestor type	Student
Type of Use	Thesis / Dissertation
PO Number	
Total	\$0.00
Terms and Conditions	

**Terms and Conditions for Permissions**

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for,

the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.

3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]  
(reference citation), copyright (year of publication)

For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME],  
advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL  
ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]  
(reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]  
(reference citation), copyright (year of publication).

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.